Leiden, 1938

ONDERZOEK VAN DOOR BIOPSIE VERKREGEN BOT VAN PATIENTEN LIJDENDE AAN HYPERPARATHYREOIDIE, MET BEHULP VAN MICRORADIOGRAFIE EN PHOSPHAATUITWISSELINGS-PROEVEN IN VITRO

LANE LIBRARY, STANFORD UNIVERSITY

D. SMEENK

ONDERZOEK VAN DOOR BIOPSIE VERKREGEN BOT VAN PATIENTEN LIJDENDE AAN HYPERPARATHYREOIDIE, MET BEHULP VAN MICRORADIOGRAFIE EN PHOSPHAATUITWISSELINGS-PROEVEN IN VITRO

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS Dr H. J. LAM, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 10 DECEMBER 1958 TE 16 UUR

DOOR

DONALD SMEENK

GEBOREN TE HURWENEN IN 1923

UITGEVERIJ EXCELSIOR - ORANJEPLEIN 96 - 'S-GRAVENHAGE

Promotor: Prof. Dr A. Querido

Het onderzoek werd verricht in de afdeling voor Stofwisselingsziekten en Endocrinologie
(Hoofd Prof. Dr A. Querido) van het Academisch Ziekenhuis te Leiden.

Voor het verrichten van deze studie werd steun verkregen van de organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk onderzoek ten behoeve van de Volksgezondheid.

Bij het maken van de microradiogrammen, het quantitatief meten ervan en bij het verwerven van de noodzakelijke technische vaardigheid zijn velen mij behulpzaam geweest of hebben hun apparatuur ter beschikking gesteld. De microradiogrammen voor qualitatief onderzoek werden aanvankelijk gemaakt in het Physisch Technisch Röntgenlaboratorium van de N. V. Philips te Eindhoven met hulp van den Heer A. Recourt, terwijl later gebruik werd gemaakt van de microradiograaf van het Laboratorium voor Physische Biochemie te Leiden (Hoofd Prof. Dr H. J. Booy). De microradiogrammen voor quantitatief onderzoek werden vervaardigd op het Anorganisch Chemisch Laboratorium van de Rijksuniversiteit te Leiden met toestemming van Prof. Dr A. E. van Arkel en hulp van Mej. G. Wessel. Voor het meten ervan stelde Prof. Dr P. Th. Oosterhoff van de Sterrewacht een microfotometer beschikbaar.

Het histologisch onderzoek werd verricht door de Heer R. O. van der Heul op het laboratorium voor pathologische Anatomie te Leiden (Hoofd Prof. Dr Th. G. van Rijssel).

Bijna alle bijschildklieroperaties werden verricht door Dr H. Muller.

Veel dank ben ik verschuldigd aan Prof. Dr A. Engström en zijn medewerkers van het Karolinska Institutet te Stockholm voor de getoonde belangstelling en de vele goede raadgevingen.

Mevrouw J. A. M. de Meulenmeester-Bayer en Mej. M. A. Janssen ben ik erkentelijk voor het verrichten van de chemische analyses, mevrouw C. de Vries-van Bilderbeek voor de hulp bij het persklaar maken van dit proefschrift.

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/onderzoekvandoor0000unse

INHOUD

Hoofdstuk I : Inleiding en vraagstelling 7

Hoofdstuk II : De microstructuur van beenweefsel . 13

Hoofdstuk III : De botbiopsie 18

Hoofdstuk IV : Microradiografie 22

Hoofdstuk V : Phosphaatuitwisselingsproeven met botweefsel in vitro 44

Hoofdstuk VI : Klinische gegevens 61

Hoofdstuk VII : Toepassing van microradiografie bij patiënten met hyperparathyreoidie .. 71

Hoofdstuk VIII : Toepassing van phosphaatuitwisselingsproeven in vitro met botweefsel van patienten met hyperparathyreoidie 78

Hoofdstuk IX : Bespreking van het verband tussen de gegevens 86

Hoofdstuk X : Nabeschouwing 90

Samenvatting 93

Summary 97

Literatuur 101

Hoofdstuk I

INLEIDING EN VRAAGSTELLING

Ofschoon de bijschildklieren reeds in 1880 door Sandstrom werden ontdekt en het ziektebeeld van de ostitis fibrosa generalisata cystica in 1891 door von Recklinghausen werd beschreven, werd eerst in 1925 het verband tussen bijschildklieren en botziekte door Mandl bij de mens bewezen. Deze genas een patiënt met een ostitis fibrosa generalisata cystica door het operatief verwijderen van een bijschildklieradenoom.

De isolatie van een parathormon bevattend extract werd in 1924 door Hanson verricht. Een jaar later werd aangetoond, dat proefdieren door behandeling met bijschildklierextracten skeletafwijkingen kregen.

De historische ontwikkeling van de kennis van de ostitis fibrosa generalisata cystica en van de hyperparathyreoidie maakt het begrijpelijk, dat lange tijd de skeletafwijkingen als kernpunt van het ziektebeeld hyperparathyreoidie werden beschouwd. Later bleek echter, dat vele patienten met hyperparathyreoidie, noch bij histologisch onderzoek, noch bij röntgenologisch onderzoek, botafwijkingen vertoonden (Albright c. s., 1937). Uit recente publicaties wordt het duidelijk, dat slechts bij een derde deel van de patienten met hyperparathyreoidie röntgenologisch skeletafwijkingen zijn aan te tonen (Black c.s , 1956). Dit lijkt merkwaardig omdat een directe werking van parathormon op het skelet is aangetoond. Collip c. s. maakten dit waarschijnlijk door ratten, na nephrectomie, met bijschildklier-extract te behandelen (1934), Barnicot c. s. door bijschildklierweefsel onder het schedeldak van een muis te implanteren (1948). Tenslotte toonde Gaillard aan, dat een celvrij bijschildklierextract een directe werking heeft op weefselkweken van het os parietale van het muizenembryo (1957) en wel in dien zin, dat de osteoclastische botresorptie wordt versterkt.

Dat skeletafwijkingen bij patienten met hyperparathyreoidie weinig worden gezien, kan ten dele verklaard

worden doordat met de gebruikte onderzoekmethoden lichte afwijkingen niet kunnen worden aangetoond. Wanneer echter de door het parathormon veroorzaakte osteoclastische botafbraak (Gaillard, 1955) gedurende jaren bestaat, zoals dit bij vele patienten met hyperparathyreoidie het geval is, kan het ontbreken van zichtbare skeletafwijkingen moeilijk worden verklaard. Het ligt meer voor de hand de verklaring te zoeken in een toeneming van de botaanmaak, die de extra botafbraak geheel of gedeeltelijk compenseert (fig. I) (B. Engfeldt c. s., 1954).

De gebruikelijke klinische onderzoekmethoden geven in het algemeen weinig inlichtingen over botaanmaak en -afbraak. De bepaling van calcium, phosphor en alkalisch phosphatase in het bloed en van calcium en phosphor in urine en faeces geven slechts indirecte gegevens over botaanmaak en -afbraak. Balansstudies kunnen een inzicht geven in de som van aanmaak en afbraakprocessen in het bot, niet in ieder proces afzonderlijk. Het röntgenonderzoek geeft, wanneer er geen locale afwijkingen zijn, een indruk van de totale hoeveelheid botmineralen, die aanwezig zijn, echter niet van de wijze waarop een bepaalde toestand bereikt is. Wanneer wij iets over de processen willen weten, die zich in het skelet afspelen bij de hyperparathyreoidie is het noodzakelijk aandacht te besteden aan methoden, die meer directe gegevens over botaanmaak en -afbraak kunnen leveren. Door histologisch onderzoek van het bot kan in bepaalde gevallen een versterkte botaanmaak of -afbraak worden vastgesteld. In vele gevallen van hyperparathyreoidie is echter het histologisch beeld geheel normaal (Albright c. s., 1937).

Naast het histologisch onderzoek staan enkele andere methoden ter beschikking, waarmede men een inzicht kan krijgen in de vernieuwingssnelheid van bot.

Met behulp van microradiografie is het mogelijk het mineraalgehalte van zeer kleine stukjes bot te meten (Engström, 1946). Een goede keus van de golflengte van de te gebruiken röntgenstralen is noodzakelijk om te voorkomen, dat het organische gedeelte van het bot een belangrijke invloed op de meetuitkomsten heeft (G. Wallgren, 1957). Daar het kalkgehalte per mm^3 toeneemt met de leeftijd van het bot (Amprino, 1952· Wallgren, 1957; Holmstrand, 1957) en de hoeveelheid organische matrix dezelfde blijft (Davies c. s., 1954), kan door het bepalen van het mineraalgehalte per mm^3 bot,

	Botafbraak ← Botaanmaak →	Kalkarmoede v.h. skelet op het Röntgenbeeld
Normaal oud individu	← →	—
Normaal jong individu	← →	—
Lichte hyperparathyreoidie	← →	—
Lichte hyperparathyreoidie	← →	+ —
Ernstige hyperparathyreoidie	← →	—
Ernstige hyperparathyreoidie	← →	+

Fig. I
Schematische voorstelling van de hypothese over het ontbreken en het ontstaan van afwijkingen in het röntgenbeeld van het skelet bij hyperparathyreoidie-patienten.

een maat worden gevonden voor de ouderdom van het onderzochte botgedeelte. Behalve met behulp van microradiografie kan het gehalte van het bot aan mineralen ook worden gemeten door interferentiemicroscopie (Barer, 1952; Davies, 1954).

Een chemische analyse is minder geschikt voor dit onderzoek, omdat hierbij een nauwkeurige volumebepaling noodzakelijk zou zijn. Dit is voor bot, waarin bindweefsel, bloedvaten en beenmergelementen voorkomen, bijzonder moeilijk. Het bezwaar van deze volumebepaling wordt bij de microradiografie ondervangen door het feit, dat hierbij alleen een diktebepaling van het te onderzoeken botslijpje noodzakelijk is. Het te meten oppervlak kan immers constant gehouden worden. Dit is bovendien zo klein, dat uitsluitend in zuiver bot gemeten wordt. De storende invloed van onverkalkt weefsel vervalt hierdoor.

Door van bot het gemiddelde mineraal gehalte per mm^3 te bepalen verkrijgt men een maat voor de verhouding tussen jong, weinig gemineraliseerd bot en oud, maximaal gemineraliseerd bot. Bij een toeneming van de afbraaksnelheid van het bot, gevolgd door een toeneming van de aanmaaksnelheid van het bot zal de gemiddelde botleeftijd dalen en zal een gemiddeld lager mineraal gehalte worden gevonden. Wanneer een toeneming van de aanmaaksnelheid zou plaats vinden, zou een normaal mineraalgehalte worden gevonden, omdat de botafbraak zowel jong als oud bot treft. Het vinden van een gemiddeld verlaagd botmineraalgehalte kan dus worden opgevat als een argument voor de geopperde hypothese over de versterkte botaanmaak bij patienten met hyperparathyreoidie.

Een geheel andere wijze van onderzoek kan eveneens een indruk geven van de vernieuwingssnelheid van bot. Door het toedienen van een radioactieve stof, die wordt opgenomen in het skelet, kan de hoeveelheid van de niet radioactieve vorm van de stof, waarin verdunning plaats vond, worden berekend uit gegevens over het verloop in de tijd van de specifieke activiteit van bloed, urine en faeces (W.E. Armstrong, 1955; F. Bronner c.s., 1956; G.C. Bauer c.s., 1955; Krane c.s., 1956). Bauer c.s. meent op grond van berekeningen hiermede een maat voor de vernieuwingsprocessen van het bot te kunnen vinden.

Door radioactieve isotopen in vitro toe te passen is het eveneens mogelijk inlichtingen te verkrijgen over de vernieuwingssnelheid van bot. De opname van ^{32}P, ^{45}Ca

of ^{35}S vindt in het skelet hoofdzakelijk plaats in kalkarme, jonge structuren (Amprino, 1952; Lacroix, 1952). Met autoradiogrammen kan worden aangetoond, dat de opneming van genoemde radioactieve stoffen hetzelfde verdelingspatroon vertoont in levend bot in vivo als in dood bot in vitro (Engfeldt c.s., 1954). Het ligt voor de hand aan te nemen, dat de totale opneming door bot in vitro uit een oplossing van een voor het onderzoek geschikte radioactieve isotoop, een weerspiegeling is van de verhouding tussen de hoeveelheid jong bot met veel ionenuitwisseling en de hoeveelheid oud bot met weinig ionenuitwisseling, die in een bepaald botmonster aanwezig is. Zoals in de beschouwing over het microradiografisch onderzoek aannemelijk werd gemaakt, is deze verhouding een maat voor de gemiddelde botleeftijd. Indien een toeneming van het aantal ionen van de botmineralen, dat aan de uitwisselingsreacties deelneemt, bij patienten met hyperparathyreoidie zou worden gevonden, zou dit pleiten voor de hypothese van de versterkte botaanmaak bij hyperparathyreoidie.

Het quantitatief meten van de hoeveelheid radioactieve stof in een stukje bot met behulp van autoradiografie is technisch moeilijk. Het lijkt eenvoudiger niet de autoradiografische methode te gebruiken, doch het bot na incubatie in een oplossing gemerkt door een radioactieve isotoop op te lossen en in de oplossing de metingen te verrichten.

Voor het onderzoek van de anorganische bestanddelen van bot komen o.a. de radioactieve isotopen van phosphor en calcium in aanmerking. Daar calcium slechts in te verwaarlozen hoeveelheden in de organische bestanddelen van bot voorkomt, is radioactief calcium geschikt om bij het onderzoek van de botmineralen te worden gebruikt. Phosphor komt wel in meetbare hoeveelheden in de organische bestanddelen van het skelet voor. Uit autoradiografische studies blijkt echter, dat bot na incubatie in een phosphaatoplossing, waarvan het phosphaat met radioactief phosphor is gemerkt, geen meetbare hoeveelheden radioactief phosphor bevat buiten de gemineraliseerde gedeelten (Leblond c.s., 1955).

Ook radioactief phosphor kan dus worden gebruikt bij het onderzoek van de mineralen van het bot.

Daar het technisch eenvoudiger is de radioactiviteit van ^{32}P te meten dan die van ^{45}Ca (het Ca-isotoop dat gemakkelijk verkrijgbaar was), werd met ^{32}P gemerkte

phosphaat gebruikt voor het onderzoek. De keuze werd mede bepaald door de apparatuur, bij het begin van het onderzoek beschikbaar, en door het gevaar verbonden aan het werken met isotopen met een zeer lange physische en biologische halveringstijd, zoals ^{45}Ca.

Op grond van de genoemde overwegingen werd een onderzoek ingesteld bij patienten met hyperparathyreoidie, waarbij naast de gebruikelijke klinische, chemische en röntgenologische onderzoekingen, door biopsie verkregen bot werd onderzocht met behulp van histologie en microradiografie. Hiernaast werd in vitro de uitwisseling van phosphaationen van het bot tegen die van de omringende vloeistof gemeten met behulp van radioactief gemerkt phosphaat. Daar de microstructuur van bot de resultaten, zowel van microradiografie als van uitwisselingsproeven beheerst, zal hieraan in het volgende hoofdstuk aandacht worden besteed.

Samenvatting

Na een korte bespreking van de historische ontwikkeling van de kennis van de hyperparathyreoidie werd de aandacht gevestigd op het weinig frequent voorkomen van röntgenologisch aantoonbare botafwijkingen bij patienten met hyperparathyreoidie, ondanks het feit, dat parathormon een directe invloed op de botstofwisseling heeft.

Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn, dat de versterkte botafbraak, veroorzaakt door een overmaat parathormon, wordt gecompenseerd door een versterkte aanmaak. Teneinde over de mate van botafwijkingen te kunnen oordelen, is het nodig een inzicht te verkrijgen in de verhouding van botaanmaak en botafbraak bij patienten met hyperparathyreoidie.

Voor de vernieuwingssnelheid van bot kan een maat worden gevonden met behulp van de bepaling van het mineraalgehalte van het bot door middel van microradiografie. Ook de mate van uitwisseling van phosphaationen van het bot tegen die van de omringende vloeistof in vitro weerspiegelt de verhouding tussen botaanmaak- en botafbraakprocessen. In het volgende onderzoek werd van deze twee methoden gebruik gemaakt. Hiernaast werden de meer gebruikelijke klinische, chemische, röntgenologische en histologische onderzoekingen verricht.

Hoofdstuk II

DE MICROSTRUCTUUR VAN BEENWEEFSEL

Bij de bestudering van de bouw van het skelet is het noodzakelijk de verschillende voor het lichaam belangrijke functies van dit orgaan voor ogen te houden. Vooral gedurende het laatste decennium is sterk naar voren gekomen, dat het skelet naast de functie van steunweefsel een belangrijke functie heeft als opslagplaats van gemakkelijk te mobiliseren mineralen, zoals calcium, phosphor en natrium (Rubin, 1953; Copp c. s., 1955; Frederickson c. s., 1955; Edelman c. s., 1952). Dat de botmatrix voor de lichaamshuishouding van betekenis is volgt reeds uit het hoge gehalte aan organische stof. Het is niet bekend of de matrix een bufferfunctie heeft, vergelijkbaar met die van het anorganische gedeelte van het skelet.

In de nu volgende beschouwing over de bouw van normaalbot zal aandacht worden besteed aan de microstructuur en wel aan de organische matrix, de botmineralen en de relatie tussen matrix en mineralen. Bovendien zullen de circulatie in het beenderstelsel, de vernieuwingssnelheid van het orgaan en de uitwisselingsreacties tussen ionen van het botkristal en ionen van de omringende vloeistof worden besproken.

De matrix is opgebouwd uit cellen, de osteocyten, en de tussenstof. Deze laatste bestaat grotendeels uit collageenvezels en een homogene substantie. Een aan de lucht gedroogd femur van het rund (Eastoe c. s., 1954) bevatte 18,6% collageen. Het watergehalte bedroeg 8,2% en het gehalte aan anorganische stof 71%. Uit deze gegevens blijkt, welk een belangrijke plaats het collageen inneemt. Het botcollageen onderscheidt zich niet van het collageen uit ander bindweefsel. Het vormt fibrillen ter dikte van 0,3 tot 0,5 micron, die onderling samenhangen en samengevoegd zijn tot bundels van 3 tot 5 micron. Bij onderzoek met behulp van electronenmicroscopie vertonen zij een dwarsstreping met een zich om de 640 Angström herhalend patroon (Robinson c. s., 1953). De ho-

mogene tussenstof is opgebouwd uit mucopolisachariden, zoals hyaluronzuur en chondroitine zwavelzuur. In gewichtsprocenten gezien is de tussenstof van weinig betekenis; de mucopolisachariden bv. vormen slechts 0,24% van het botgewicht. Over de biologische betekenis van de amorphe tussenstof is nog weinig bekend. Mogelijk heeft deze een functie bij de mineralisatie en demineralisatie, omdat bij deze processen steeds een depolimerisatie van de mucopolisachariden wordt gezien, zich uitend in een metachromatische kleurbaarheid.

Over de chemische samenstelling van het anorganische gedeelte van het bot bestaat veel verschil van mening. Deze meningsverschillen betreffen niet zozeer de hoeveelheden van de verschillende elementen die aanwezig kunnen zijn, als wel de ruimtelijke structuur waarin zij voorkomen.

De mineralen van het bot bestaan voor een zeer groot deel uit calcium en phosphor. Het skelet van een volwassen man van 70 Kg weegt ongeveer 9 Kg, bevat 1000 g calcium wat overeenkomt met 99% van het calcium van het lichaam, en 470 g phosphor, wat overeenkomt met 90% van het phosphor van het lichaam (Mitchell c. s., 1945). De verhouding tussen de hoeveelheden calcium en phosphor in het bot is enigszins wisselend, en bedraagt ongeveer 2,1. Vermoedelijk bestaan de botkristallen uit hydroxy-apatite $[Ca_3(PO_4)_2]_3Ca(OH)_2$ (Hendricks c. s., 1950). De calcium-phosphorverhouding bedraagt hierin 2,14. Hogere waarden kunnen worden verklaard door de adsorptie van calciumhydroxide, lagere door adsorptie van phosphaten. Naast de hypothese van de hydroxy-apatite structuur vindt de veronderstelling, dat de kristallen zijn opgebouwd uit tricalciumphosphaat, warme verdedigers (Dallemagne, 1952). Hierbij zou de calcium-phosphor verhouding 1,94 moeten zijn. De gevonden hogere waarden kunnen worden verklaard door adsorptie van calciumhydroxyde en -carbonaat aan te nemen. Behalve de twee genoemde veronderstellingen over de structuur van de botkristallen zijn er vele andere mogelijkheden geopperd (Dixon c. s., 1956), die echter alle minder goed met de resultaten van het chemisch en physisch botonderzoek overeenstemmen.

Naast phosphor en calcium bevat het bot andere elementen. Van groot belang is het skeletnatrium. Volgens gegevens van voor 1950 bevindt zich in het skelet van een volwassene ongeveer 1000 mEq. Na., d. w. z. 30% van de

totale hoeveelheid, die in het lichaam aanwezig is. Nieuwere gegevens (Davies c. s., 1952) pleiten voor een nog hoger natriumgehalte. Het natrium bevindt zich slechts voor een zeer klein deel als vrij natriumchloride in het skelet. Het grootste deel is opgenomen in het oppervlak van de kristallen. Uitwisselingsproeven met radioactief natrium tonen aan, dat ongeveer de helft van het botnatrium een vrije uitwisseling met de extracellulaire vloeistof heeft (Edelman c. s., 1952).

Ook carbonaationen komen in belangrijke hoeveelheden in het skelet voor. Bij verhitting van bot komt ongeveer 5% van het gewicht aan CO_2 vrij (Dallemagne c. s., 1955). De hoeveelheid kooldioxyde, die in het skelet wordt gebonden, hangt af van de verhouding tussen phosphaat- en carbonaationen in het serum (Neumann, 1958).

Magnesium komt in het skelet voor in de orde van grootte van 0,1%. Bij kalveren daalt het magnesiumgehalte van het bot tot ongeveer de helft, wanneer men de hoeveelheid magnesium in het voedsel sterk vermindert (Baxter, 1955).

Het watergehalte var bot hangt af van de ouderdom van het weefsel. Zeer jong bot zou tot 60% water bevatten, ouder bot bevat 8 tot 10% water (Eastoe c. s., 1954). Het water in het bot is waarschijnlijk geheel gebonden aan de apatite kristallen. De hoeveelheid vrij water is te verwaarlozen. Bij centrifuge experimenten bleek het waterverlies van bot zeer gering (Neuman c. s., 1953).

De botkristallen zijn bijzonder klein. Gegevens over de afmetingen van de kristallen werden verkregen met behulp van röntgendiffractie (Carlström c. s , 1954), en electronenmicroscopie (Robinson c. s., 1953). De lengte van de kristallen bedraagt 180 tot 300 Ångström, terwijl de breedte slechts weinig minder is. De dikte daarentegen bedraagt slechts 20 tot 50 Angström. Door deze zeer kleine dimensies wordt het kristaloppervlak enorm groot. Het oppervlak van een gram bot werd bepaald op 100 tot 250 m^2 (Hendricks, 1953). Het gehele skelet van een volwassen man zou een oppervlakte hebben van 100 hectare (McLean c. s., 1955).

Over de structurele samenhang van collageenvezels en botkristallen zijn nog weinig gegevens beschikbaar. Bij onderzoek van onontkalkt bot met de electronenmicroscoop lijken de kristallen tegen de vezels te liggen in een rangschikking, die overeenkomt met de 640 Angström dwarsstreping. Een lange as

van het kristal, de c-as, is evenwijdig aan de lengterichting der vezels. Een platte zijde van het plaatvormige kristal ligt tegen de vezel, of is opgenomen in het vezeloppervlak.

De bloedcirculatie in het skelet is zeer intensief. Uit de snelheid, waarmede radioactief calcium uit het bloed van ratten verdwijnt, kan worden berekend dat meer dan 5% van het hartminutenvolume gebruikt wordt voor de doorstroming van het beenderstelsel (Frederickson c.s., 1955). Door infusieproeven met aethyleendiamine-tetra-azijnzuur (een stof die een complexe binding met calcium aangaat) kon bij honden worden aangetoond, dat meer dan 8% van de lichaamscirculatie door het skelet gaat (Copp c.s., 1955). De grote intensiteit van de circulatie in pathologisch bot is uit de kliniek bekend bij de ziekte van Paget. Hierbij kunnen immers sterk verkorte circulatietijden worden gevonden, met een verhoging van de botcirculatie tot 20 maal de normale (Edholm c.s , 1945).

Over de vernieuwingssnelheid van normaal bot zijn geen nauwkeurige gegevens bekend. Wel zijn er enkele waarnemingen, die wijzen op een zeer actieve vernieuwing, ook in ogenschijnlijk weinig actief bot. Uit microradiografische studies van de verkalkingssnelheid van foetaal bot (Wallgren, 1957) en van callusvorming bij bottransplantaten (Holmstrand, 1957), blijkt dat nieuw aangelegd bot in ongeveer vijf weken een bijna maximale verkalkingsgraad bereikt. Daar in normaal bot talrijke systemen van Havers worden gezien met een belangrijk lager mineraalgehalte dan het omringende bot (Amprino en Engström, 1952), moet worden aangenomen dat deze systemen door vernieuwing kort geleden opnieuw zijn aangelegd. Deze aanleg van jong bot in volgroeide skeletdelen is physiologisch gezien van groot belang, omdat het lichaam hierdoor de beschikking houdt over skeletgedeelten, die zeer gemakkelijk toegankelijk zijn voor ionenuitwisseling.

Over de aard van deze uitwisselingsprocessen is nog weinig met zekerheid bekend Uit proeven in vitro met verschillende apatiten en met botpoeder blijkt, dat het uitwisselingsproces in drie phasen verloopt (Neuman, 1958), namelijk een eerste met zeer grote uitwisselingssnelheid, een tweede met een kleine, en een derde met een zeer kleine uitwisselingssnelheid. Als verklaring voor dit verloop geeft Neuman aan, dat de eerste phase

een uitwisseling zou betreffen van ionen uit de omringende vloeistof met ionen uit de watermantel die gebonden is aan het apatite kristal. De tweede phase in het uitwisselingsproces, die veel langer duurt en vooral van belang is van één tot twaalf uur na het begin van de proef, is de uitwisseling van ionen van het kristaloppervlak tegen ionen uit de watermantel. Tenslotte zou de derde, zeer langzaam verlopende uitwisseling berusten op uitwisseling van ionen uit het kristaloppervlak tegen ionen uit het inwendige van het kristal. De derde phase van de uitwisseling duurt zo lang, dat zelfs na weken geen aequilibrium wordt bereikt.

De grotere toegankelijkheid van jong bot t.o.v. die van oud bot voor uitwisselingsprocessen zou verklaard kunnen worden doordat de ruimten tussen de kristallen in jong bot groter zijn dan die in oud bot en dat hierdoor de diffusiemogelijkheden in jong bot die in oud bot verre overtreffen (Neuman c. s., 1958).

Samenvatting

Er werd op gewezen, dat beenweefsel naast de functie van steunweefsel een belangrijke functie heeft als opslagplaats van gemakkelijk te mobiliseren ionen.

Bij de bespreking van de microstructuur van bot wordt aandacht besteed aan de matrix, de kristallen en de relatie tussen matrix en kristallen.

Bovendien werd de circulatie in het beenderstelsel, de vernieuwingssnelheid van het orgaan en de uitwisselingsreacties tussen ionen van het botkristal en de ionen van de omringende vloeistof besproken.

Hoofdstuk III

DE BOTBIOPSIE

De techniek van de botbiopsie, waarbij met behulp van een holle boor stukjes bot worden verkregen, verschaft op eenvoudige wijze beenweefsel voor onderzoek. Wanneer de biopsie in de voorste centimeters van de crista iliaca wordt verricht, is het risico van de ingreep gering. Organen, waarvan de beschadiging ernstige gevolgen voor de patient kan hebben, zijn hier niet aanwezig. Het gevaar van infectie, dat uiteraard bij iedere ingreep waarbij de continuiteit van de huid onderbroken wordt, aanwezig is, is bij een goede techniek minimaal te achten. Naar onze ervaring (50 biopsieën) en die van anderen komt nabloeding bij patienten met een normaal bloedings- en stollingsmechanisme niet voor.

De patient ondervindt, naar onze ervaring, de botbiopsie niet als een zeer onaangename ingreep. Die patienten, waarbij een sternumpunctie werd verricht en eveneens een biopsie van de crista iliaca, vonden allen de eerste ingreep pijnlijker dan de laatste. Vermoedelijk is dit te verklaren doordat bij de botbiopsie, in tegenstelling tot bij de sternumpunctie, geen vacuum wordt gemaakt.

De door ons gebruikte boor werd in 1954 beschreven door Sacker en Nordin, en wordt gekenmerkt door zijn eenvoud (fig. II A). De buitencanule dient om de binnencanule te fixeren en om te voorkomen dat dieper dan 1 cm wordt geboord. De binnencanule is de eigenlijke boor en heeft een binnendiameter van 6 mm.

De techniek van de botbiopsie

De patient krijgt gedurende één dag, te beginnen twee uur vóór de botbiopsie een „breed spectrum" antibioticum. Gewoonlijk wordt voor de biopsie de linker crista iliaca gekozen, omdat hier voor een rechtshandige operateur de boring het gemakkelijkst is uit te voeren. De

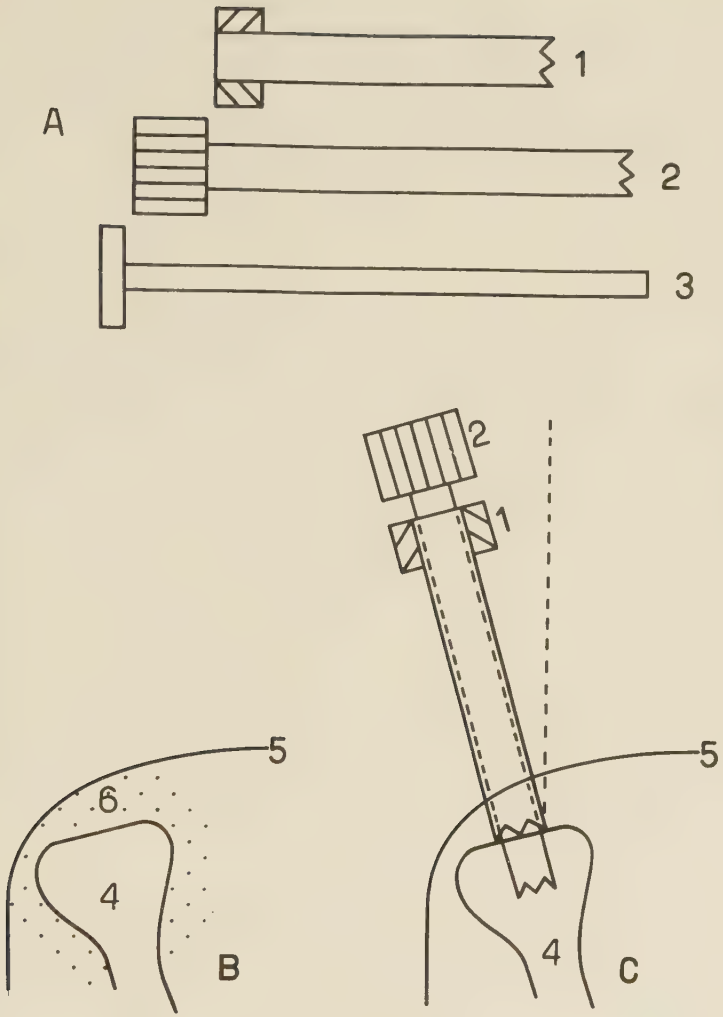


Fig. II
Botboor volgens Sacker en Nordin

A. Onderdelen van de botboor.
   1. buitencanule
   2. binnencanule (botboor).
   3. mandrijn
B. Te verdoven gebied.
   4. crista iliaca.
   5. huid.
   6. met anaesthesie vloeistof geinfiltreerd gebied.
C. Botboor gedeeltelijk ingebracht.

patient wordt in liggende houding gebracht. De huid in het gebied van de crista iliaca wordt gedesinfecteerd. Met een 2% novocaineoplossing wordt vervolgens locaal verdoofd, waarbij vooral aandacht wordt besteed aan een goede anaesthesie van het periost van de crista iliaca. Het verdient aanbeveling om ook de zijkanten van het blad van het ilium tot 1 cm beneden de crista iliaca te verdoven (fig. II B). Hierna wordt een huidincisie gemaakt van $1\frac{1}{2}$ cm lengte boven de crista iliaca, die van $2\frac{1}{2}$ cm achter de spina iliaca anterior superior naar dorsaal verloopt. Het subcutane vetweefsel wordt gespleten door een arteriepincet in de wond te openen. Een kleine wondspreider vergemakkelijkt de ingreep. De fascie van de buikspieren wordt door het spreiden van een puntig schaartje gekliefd. Vervolgens wordt de boor met mandrijn en buitencanule op het periost gezet. De boor staat bijna loodrecht op de crista iliaca en maakt met de loodlijn een hoek van ongeveer 30^{o} naar craniaal en 15^{o} naar lateraal. De buitencanule wordt door flinke druk op de crista iliaca gefixeerd. De mandrijn wordt verwijderd. De binnenboor wordt al draaiende met zachte druk door de cortex van de crista iliaca geboord, en vervolgens in de spongiosa gedreven (fig. II C), totdat de binnencanule met het verbrede boveneind op de buitencanule rust. Door voorzichtig heen en weer bewegen wordt de verbinding tussen het grondvlak van het uit te boren botcylindertje en de spongiosa van de crista iliaca verbroken. Door de boor onder een geringe hoek met de boorrichting terug te trekken wordt het botcylindertje uit de crista iliaca verwijderd. Vervolgens wordt het wondje met 1 of 2 Donati-hechtingen gesloten.

De keuze van de plaats van de biopsie wordt eensdeels bepaald door de gemakkelijke bereikbaarheid, anderdeels door de overweging dat het crista iliaca-bot grotendeels uit spongiosa bestaat. De spongiosa heeft door de fijnheid van de balkjesstructuur en het grote oppervlak een innig contact met de lichaamsvloeistoffen. Wanneer een algemeen proces skeletopbouw of -afbraak veroorzaakt, worden de verschijnselen hiervan het eerst in de spongiosa gezien (McLean c. s., 1941; Neuman c.s., 1958; Nicolaysen c. s. , 1953; Engström c. s. , 1958; Amprino c. s. , 1952; Bauer, Aub en Albright, 1929). Het ligt dus voor de hand bij de bestudering van metabole botziekten, met name van de hyperparathyreoidie, het eerst afwijkingen in de spongiosa te verwachten.

Bij de onderzochte patienten met hyperparathyreoidie werd slechts bot uit de crista iliaca verkregen, zodat een vergelijking van verschillende biopsieplaatsen in dit onderzoek niet mogelijk is. Over mogelijke verschillen veroorzaakt door kleine variaties van de plaats van de biopsie worden in de volgende hoofdstukken gegevens verstrekt.

Samenvatting

Besproken werd de techniek van de biopsie uit de crista iliaca met behulp van een holle boor.

Uit literatuur gegevens bleek dat spongieus bot in het algemeen intensiever betrokken is bij algemene stofwisselingsprocessen dan compact bot. Het botmonster dat afkomstig is van de crista iliaca, bestaat hoofdzakelijk uit spongiosa, en is daarom zeer doelmatig voor onderzoek bij metabole botziekten.

Hoofdstuk IV

QUANTITATIEVE MICRORADIOGRAFIE

I. *Algemene beschouwingen*

Het is mogelijk in zeer kleine stukjes bot het mineraal gehalte, uitgedrukt per volume eenheid, te bepalen door de absorptie van zachte röntgenstralen door een daartoe vervaardigd botslijppraeparaat te meten. Omdat in de samenstelling van het anorganische gedeelte van bot slechts kleine variaties voorkomen (Klement, 1936) en omdat een nauwkeurige omschrijving van de botzouten moeilijk is, wordt het woord „mineraal" gebruikt om het anorganische gedeelte van beenweefsel aan te duiden.

Dat inderdaad de botzouten verantwoordelijk zijn voor de absorptie van de röntgenstralen (Engström c.s., 1950; Davies c.s., 1954) volgt uit de volgende berekening. De absorptie E van zachte röntgenstralen in een botslijppraeparaat kan worden uitgedrukt in de volgende formule:

$$E = E_1 + E_2 = \log I_o/I = \mu_1/\rho_1 m_1 + \mu_2/\rho_2 . m_2$$

waarin I_o intensiteit van het opvallend röntgenlicht,
I intensiteit van het doorvallend röntgenlicht,
μ de lineaire absorptie-coëfficient,
ρ het soortelijk gewicht,
m de massa per cm^2.
De indices 1 en 2 geven respectievelijk aan het anorganische en het organische gedeelte van het bot.

Daar nu bij benadering voor bot geldt: $\mu_1/\rho_1 : \mu_2/\rho_2 = 10 : 1$ bij het gebruik van röntgenstralen met een golflengte varierend van 0,5 Å tot 1,5 Å en $m_1 : m_2 = 3 : 1,3$, verhouden E_1 en E_2 zich tot elkaar als 30 : 1,3 (K. Holmstrand, 1957). Dit betekent dus dat de absorptie veroorzaakt door de organische bestanddelen van het bot, inderdaad zeer klein is t.o.v. de absorptie, die het gevolg is van de minerale zouten.

Bovendien is het gehalte aan organische stoffen in

mineraalrijk en mineraalarm bot vrijwel gelijk (Davies c.s , 1954), waardoor de microradiografisch gevonden verschillen terug te voeren zijn op variaties in de hoeveelheid botzouten per volume-eenheid. Dit kon ook experimenteel worden aangetoond (Engström c.s , 1950). Een verschil in samenstelling van de botzouten als verklaring voor de variaties moet onwaarschijnlijk worden geacht (Klement, 1936).

Ofschoon de microradiografie reeds lang geleden werd beschreven (Goby, 1913), werd een algemene toepassing van deze methode pas ingevoerd, nadat het mogelijk werd zachte röntgenstralen te verkrijgen uit gesloten röntgenbuizen. Vooral Engström en medewerkers hebben belangrijke onderzoekingen verricht over de techniek en de toepassing van de microradiografie met behulp van door mica-beryllium vensters gesloten röntgenbuizen (A. Engström c.s., 1946, '54, '55, '56).

Voor het onderzoek van bot is deze methode van belang, omdat het mineraalgehalte van het bot per volume-eenheid ermee bepaald kan worden in zeer kleine monsters. De bepaling van het mineraalgehalte van het bot is van grote betekenis, omdat er een vast verband bestaat tussen het gehalte aan anorganische stof en de leeftijd van beenweefsel. Wallgren (1957) toonde dit verband aan bij het menselijk foetus zowel door vergelijking van bot van foetus van verschillende leeftijd als door vergelijking in één foetus van structuren van verschillende ouderdom. Holmstrand (1957) kwam bij de bestudering van de verkalkingssnelheid van callus bij het konijn tot volkomen vergelijkbare resultaten. Amprino (1951) had reeds aangetoond, dat de mineralisatie van bot bij zeer verschillende diersoorten op dezelfde wijze verloopt.

De resultaten van deze onderzoekingen waaruit blijkt, dat de mineralisatie van bot onder verschillende omstandigheden en bij verschillende species en individuen op vergelijkbare wijze verloopt, maakt het aannemelijk, dat we hier met een algemene biologische wetmatigheid te maken hebben. Hierdoor wordt het mogelijk uit metingen van het mineraalgehalte van botweefsel een oordeel te vormen over de leeftijd van de onderzochte botgedeelten.

De versterkte botafbraak bij patienten met hyperparathyreoidie behoeft geen moeilijkheden te geven bij de interpretatie van de gegevens over het mineraalgehalte van het bot, omdat bij de botafbraak matrix en mineralen

Fig. III

Bot van een hyperparathyreoidiepatient.
Contactmicroradiogram van een botslijppraeparaat. Vergroting ca. 150 maal. De grote zwarte velden zijn de gebieden van bloedvormend weefsel in de spongiosa. Kalkrijk bot is licht grijs, Kalkarm bot donker grijs. De kleine donkere stipjes in het bot zijn veroorzaakt door de osteocyten. Links even beneden het midden van de photo is een jong Havers-systeem zichtbaar.

Fig. IV

Bot van een hyperparathyreoidiepatient.
Voor verklaring zie ook fig. III.
Opvallend is het grote aantal jonge Havers-systemen. In een resorptielacune, even rechts van het midden van de photo, is een laagje kalkarm bot afgezet.

Fig. V

Normaal bot.
Voor verklaring zie ook fig. III.
Ook op deze photo zijn een groot aantal Havers-systemen te zien; de variaties in zwarting (mineraal gehalte) zijn echter veel geringer dan in figuur III en IV.

Fig. VI

Normaal bot.
Voor verklaring zie ook fig. III.

Fig. III

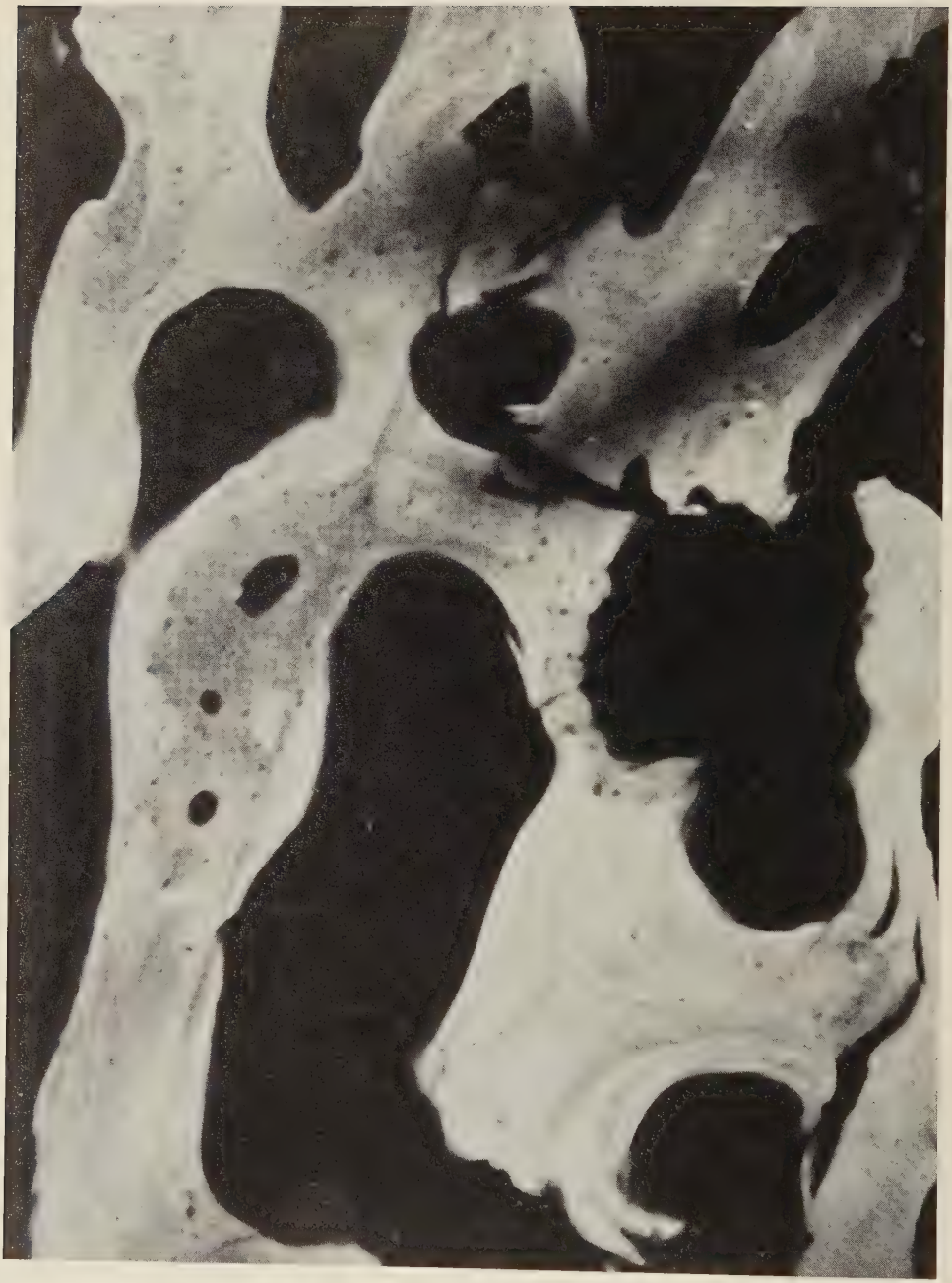


Fig. IV

Fig. V

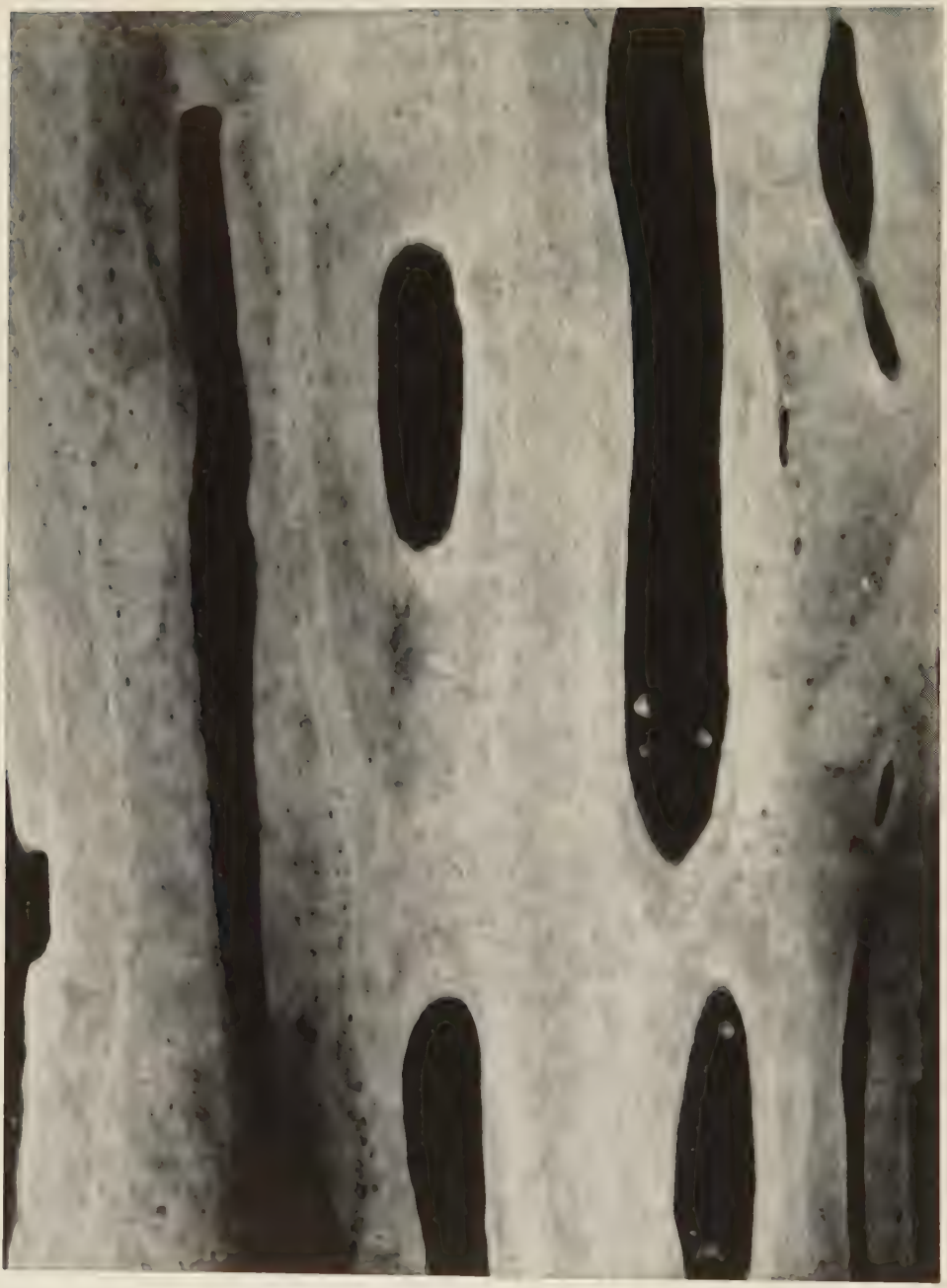


Fig. VI

gelijktijdig verdwijnen (McLean c. s., 1941; Bloom c. s., 1941; Amprino, 1952).

Het microradiografisch onderzoek kan qualitatief worden verricht. Met een optimale techniek kunnen mineralisatieverschillen van 1% in één röntgenopname zichtbaar worden gemaakt (Holmstrand, 1957).

Bij enkele van onze patienten met hyperparathyreoidie werd een karakteristiek beeld verkregen door een qualitatief contact-microradiogram van een botslijppraeparaat te maken (zie fig. III, IV, V, VI). Opvallend is de toeneming van de jonge, kalkarme Havers-systemen (op de photo donker grijs) bij de patienten met hyperparathyreoidie t. o. v. de contrôlepersonen.

In het algemeen gelukte het echter niet om met een qualitatief contact-microradiogram afwijkingen in het bot van patienten met hyperparathyreoidie aan te tonen. Het qualitatief onderzoek is waarschijnlijk daarom zo weinig bevredigend, omdat de te onderzoeken botslijppraeparaten in dikte wisselen en daardoor een standaardisatie van de techniek erg moeilijk is. Bovendien kan bij het qualitatief onderzoek wél een indruk worden verkregen van de variaties van het gehalte aan mineralen in het bot in één praeparaat, echter niet van het totaal gehalte aan mineralen per volume-eenheid.

Daarom werd besloten over te gaan op de quantitatieve microradiografie. De contactmethode werd boven de projectiemethode verkozen, omdat bij de eerste techniek minder hoge eisen aan de opstelling van praeparaat en film worden gesteld en omdat de grootte van de antikathode van de te gebruiken röntgenbuis, binnen zekere grenzen, van weinig belang is. Bovendien zijn de met contact-microradiografie verkregen beelden voldoende groot voor photometrisch onderzoek. De verkregen zwartingen werden vergeleken met de zwarting, veroorzaakt door twee trapwiggen, ieder gemaakt van 10 aluminiumblaadjes van ca. 10 µ dik (0,257 gram/cm^2). De lineaire absorptiecoëfficiënt van bot en van aluminium is bij de door ons gebruikte golflengte, 20 KV x-stralen gefiltreerd door 20 µ aluminium, practisch gelijk aan die van bot. Maureen Owen (1956) vond voor een chroom-antikathode straling van 20 KV slechts 1% afwijking in absorptiecurve tussen aluminium en bot. Zij gebruikte hiervoor bot ter dikte van 50 en aluminium ter dikte van 33 micron.

Voor de metingen van de lineaire absorptiecoëfficient volgens de formule

$$I = I_o \cdot e^{-\mu t}, \quad \text{waarin}$$

I intensiteit van het doorvallend x-licht,
I_o intensiteit van het opvallend x-licht,
e grondgetal van de natuurlijke logarithmen,
μ lineaire absorptiecoëfficient
t dikte praeparaat,

is het noodzakelijk monochromatisch röntgenlicht te gebruiken, terwijl uitsluitend gemeten mag worden bij die zwartingen, waarbij een lineair verband bestaat tussen filmzwarting en de toegevoerde röntgenenergie.

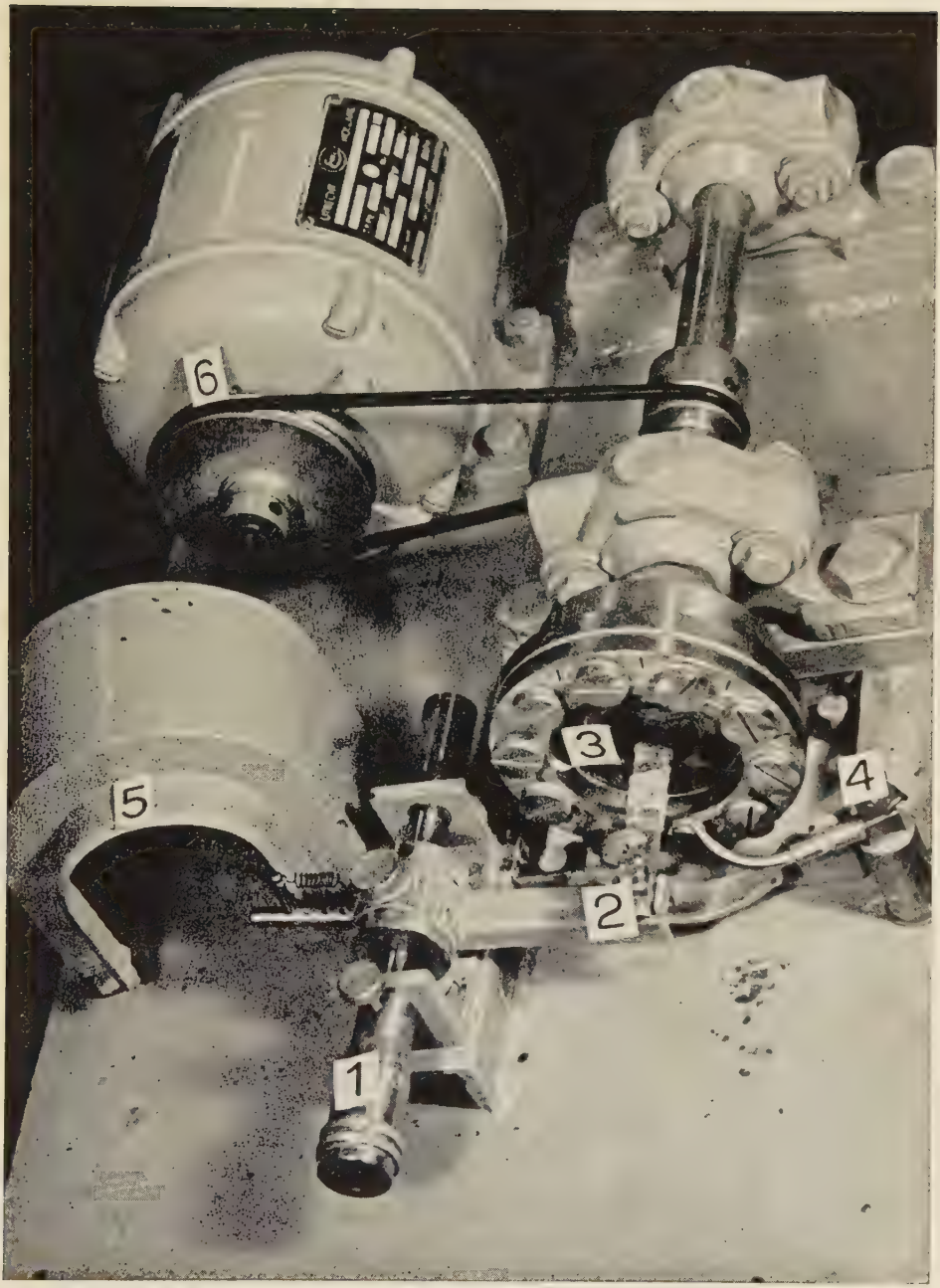
Het gebruik van een aluminium trapwig als vergelijkingsobject werd als methode gekozen, omdat hierbij polychromatisch röntgenlicht kan worden gebruikt. Bovendien kan worden gemeten, wanneer het verband tussen zwarting (density = D) en de logarithme van de toegevoerde energie (D log E curve) niet geheel lineair is.

Bij het gebruik van aluminium folie als vergelijkingsobject zijn de voorwaarden van de metingen technisch eenvoudig te verwezenlijken. Hiertegenover staat echter, dat de bepaling van de lineaire absorptiecoëfficient een absolute waarde als uitkomst geeft, terwijl bij het gebruik van aluminium als maatstaf slechts indirect absolute waarden kunnen worden verkregen.

II. *Beschrijving van de techniek*

1. Het botslijppraeparaat

Na de biopsie van de crista iliaca wordt het te onderzoeken botmonster 24 uur bewaard in 96% alcohol en vervolgens geheel watervrij gemaakt in absolute alcohol en benzoyl benzoaat. Hierna wordt het bot ingebed in de monomeer van methylmetacrylaat, wat met behulp van benzoylperoxyde als catalysator in 24 uur bij 37°C polymeriseert. Het inbedden in methylmetacrylaat gebeurt in gelatine capsules die na voltooide polymerisatie gemakkelijk in warm water verwijderd kunnen worden. Het blokje wordt nu, nadat het aan een balkje van kunsthars gelijmd is, met een koperbladzaag (fig. VII), waarvan de rand is voorzien van diamantpoeder (Jansen, 1951) ge-



Figuur VII
Botzaag (Jansen 1951)

1. micrometer verstelschroef
2. balkje van kunsthars, waaraan het praeparaat is bevestigd.
3. zaagblad
4. watertoevoer
5. afschermingshuis, dat over de zaag geplaatst wordt.
6. electromotor

Fig. X

Ongeveer tien maal vergroot beeld van een microröntgenphoto

Werkelijke grootte 15 x 5 mm

1. schaalverdeling
2. eerste aluminium trapwig
3. botmonster
4. tweede aluminium trapwig

zaagd in schijfjes van ± 100 micron. Deze schijfjes worden onder water tussen twee matglazen platen geslepen tot de gewenste dikte (30 tot 90 micron). Met behulp van stalen plaatjes wordt het scheef afslijpen voorkomen (fig. IV). Teneinde krom trekken te verhinderen worden de verkregen slijppraeparaten tussen objectglaasjes bewaard.

De dikte van de slijppraeparaten wordt bepaald door de scherp afgesneden zijkanten op vele plaatsen te meten met een oculair micrometer onder het microscoop (obj. 40 x, oc. 12 x). Een gemiddelde dikte wordt uit deze metingen berekend.

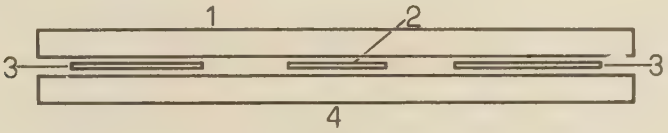
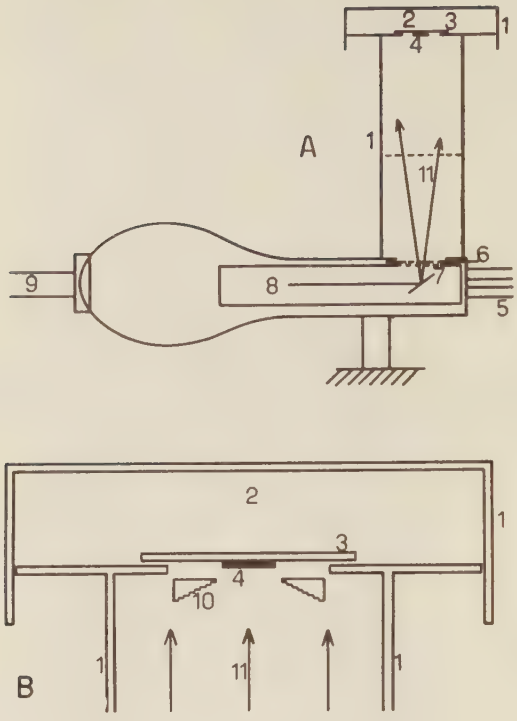


Fig. VIII
Het slijpen van het gezaagde stukje bot tussen matglas onder water.
1. bewegende matglas plaat.
2. botstukje.
3. stalen plaatjes.
4. stilstaande matglasplaat.

2. De röntgenphoto

Voor de quantitatieve microradiografie werden de röntgenphoto's gemaakt met een Enraf röntgendiffractietoestel, met een Philips koperantikathode röntgenbuis met een focusgrootte van 10 mm^2 en een mica-berylliumvenster. Een filter van 20 micron aluminium werd gebruikt (fig. IX, nr. 6).

De cassette voor film en praeparaat werd gemaakt van aluminium. Om secundaire straling te voorkomen werden geen onderdelen van koper gebruikt. De schuimplastic bekleding van de achterwand zorgt voor een goed contact tussen praeparaat en photografische plaat. Voor film en praeparaat werd een rechthoekige opening van 15,5 x 5 mm gemaakt. In deze opening van de cassette bevinden zich een schaalverdeling en twee aluminium trapwiggen, ieder bestaande uit 10 trappen met een dikte toeneming van respectievelijk 10 micron en 9,6 micron per trap (zie fig. IX, nr. 10). Het gebruikte aluminiumblad heeft een gewicht van 2,57 mg per cm^2 van 10 micron dik. Een beeld van de verkregen röntgenphoto wordt gegeven in fig. X.



A. Schema van de opstelling van röntgenbuis, preparaat en gevoelige plaat bij het maken van microradiogrammen.
B. Detail van de cassette.
1-cassette, 2-schuimplastic, 3-gevoelige plaat, 4-botslijppreparaat, 5-water-koeling, 6-filter, 7-beryllium venster, 8-röntgenbuis, 9-stroomkabel, 10-aluminium trapwig, 11-röntgenbundel.

Als photografisch materiaal werd gekozen de Eastman Kodak 649-0 plaat en de Kodak M.R.-plaat, daar deze een groot oplossend vermogen hebben, resp. 5000 en 1000 lijnen per mm en een zeer gelijkmatige emulsielaag (Engström c.s., 1951).

Bij het maken van de röntgenphoto (zie fig. IX) werd het venster van de röntgenbuis op 25 cm afstand van het praeparaat gebracht. De opnamen werden gemaakt met 20 kV en 25 mA. De belichtingstijden varieerden van 30

tot 45 minuten bij het gebruik van de Eastman Kodakplaat 649-0, en tussen 1 en 6 minuten bij het gebruik van de Kodak M.R.-plaat.

De belichtingstijden bij het maken van de röntgenphoto werden zo gekozen, dat een gunstige zwartingsgraad werd bereikt. De zwartingsgraad D, die in de photometer wordt gemeten, kan met behulp van de volgende formule worden berekend: $D = \log_{10} I_o/I_s$, waarin I_o de intensiteit van het doorvallend licht in een onbelicht filmgedeelte en I_s de intensiteit van het doorvallend licht in een belicht filmgedeelte. Een gunstige zwartingsgraad voor photometrisch onderzoek is kleiner dan 0,7; gewoonlijk bedroeg de zwartingsgraad ongeveer 0,4.

Ontwikkeld werd in Kodak 19B ontwikkelaar bij kamertemperatuur gedurende vijf minuten onder voortdurend bewegen van het ontwikkelbad en gefixeerd in een zuur fixeermiddel gedurende vijf minuten. Na tien minuten wassen in stromend water werden de photo's gedroogd.

3. Photometrie

Voor het photometrisch onderzoek werd gebruik gemaakt van de zelfregistrerende photometer van de Leidse sterrewacht (zie fig. XI). De registratie van het doorvallend licht was zo gevoelig, dat met een lichtbundeltje van slechts 20 micron doorsnede kon worden volstaan. Als verlichting werd een 15 Watt 6 Volt lamp, gevoed door een accumulator van grote capaciteit, gebruikt. De lichtbundel van de photometer werd zo klein gekozen om zoveel mogelijk randeffecten te voorkomen. Bovendien kan, bij het gebruik van een kleine bundel, het aantal aflezingen in de curve groot worden.

Praeparaat en registratiepapier werden bewogen door eenzelfde electromotor, zodanig dat de snelheid van het registratiepapier 50 maal zo groot is als die van het praeparaat. Het doorvallend licht werd via een „photomultiplicator", een versterker-apparatuur en een snaargalvanometer geregistreerd op photografisch papier. Twee voorbeelden van photometercurves worden gegeven in fig. XII.

4. Berekening van het aluminium aequivalent van het bot

De hoogten van de photometeruitslagen van beide „alu-

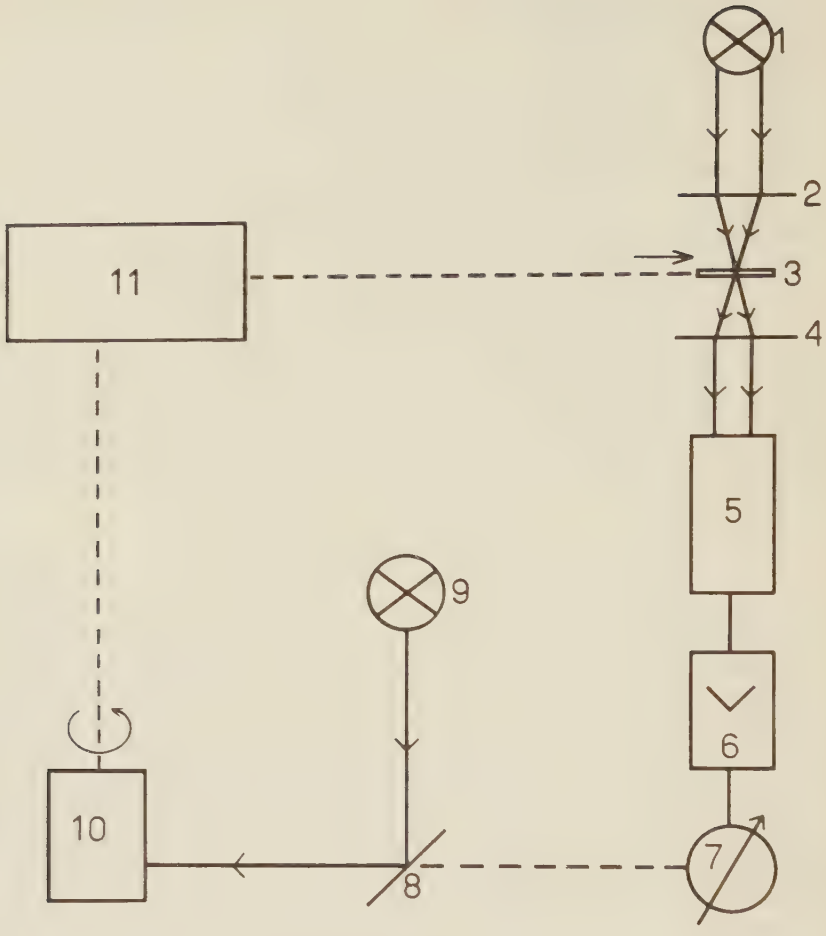


Fig. XI
Zelfregistrerend photometer.

1. lamp.
2. optiek.
3. te meten röntgenphoto.
4. optiek.
5. „photo" multiplicator.
6. versterker.
7. galvanometer.
8. galvanometer spiegel.
9. galvanometer lichtbundel.
10. registratietrommel.
11. electromotor, drijft de registratietrommel (10) aan en bovendien het verplaatsingsmechanisme voor de te onderzoeken röntgenphoto (3).

minium trapwiggen" werden gemeten en aan de hand van deze uitkomsten werd een curve getekend met het aantal micra aluminium als abscis en het aantal mm galvano-

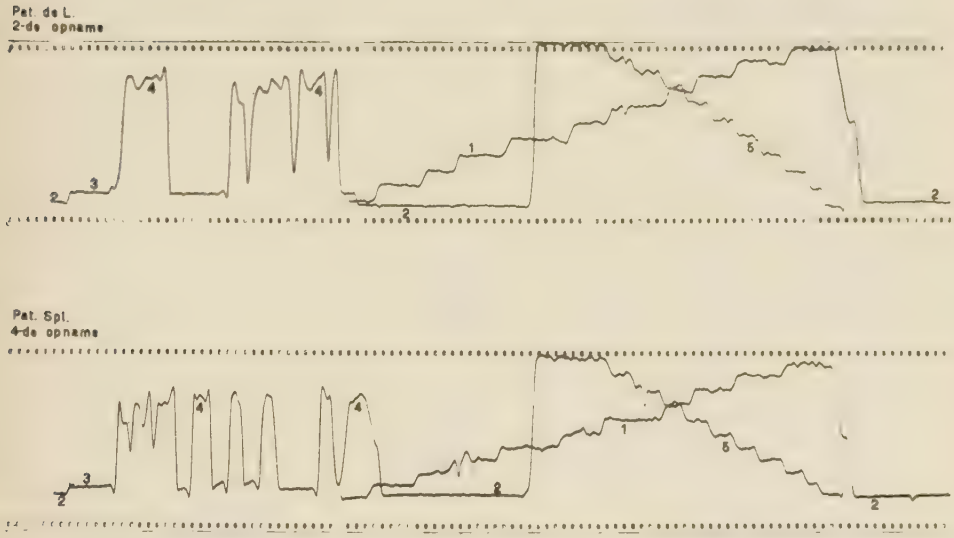


Fig. XII
Twee voorbeelden van photometer-curves:
1. aluminium trapwig I.
2. basislijn.
3. begin van het plastic inbeddingsmateriaal,
4. botbalkjes.
5. aluminium trapwig II.

meteruitslag als ordinaat. Als basis van de curve werd de galvanometeruitslag genomen op die plaatsen, waar de röntgenstralen de film ongehinderd konden bereiken (fig. XII, nr. 2). Met behulp van doorzichtig mm-papier werd de hoogte van de photometercurve van het „bot" elke mm afgelezen. Dit is noodzakelijk, omdat het verband tussen zwarting en aluminiumdikte niet lineair is (fig. XIII), en dus niet kan worden volstaan met het oppervlak van de curve te delen door de lengte en de verkregen gemiddelde hoogte om te rekenen in een aluminium-aequivalent. De verkregen waarden werden met behulp van de curve, die de zwarting – veroorzaakt door de aluminiumwiggen – weergeeft, omgerekend in aequi-

valente micra aluminium. Vervolgens werd hiervan, na omrekening op 100 micron bot, een gemiddelde met een standaarddeviatie berekend.

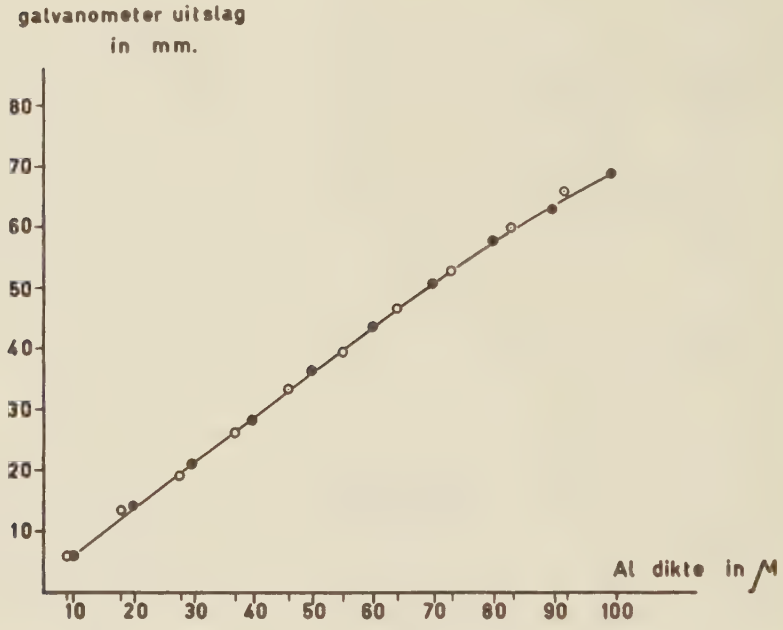


Fig. XIII
Voorbeeld van een curve, die het verband aangeeft tussen de dikte van de trappen van de aluminium wiggen en de photometer-uitslag.
• eerste trapwig;
o tweede trapwig.

III. *Meting van de proeffout*

Om een indruk te krijgen van de grootte van de proeffout werd een botslijppraeparaat vijf maal gemeten. De verkregen uitkomsten zijn vermeld in tabel 1. Bij een gemiddelde waarde van 78,9 micron aluminium voor 100 micron bot werd een standaarddeviatie van 2,5 gevonden. Vervolgens werden bij ieder van drie patienten postmortem vijf biopsieën genomen, drie uit de linker crista iliaca en twee uit de rechter crista iliaca of omgekeerd.

Tabel 1
Proeffout quantitatieve microradiografie

Pat.	Gesl.	Leeft.	Plaats van de crista iliaca biopsie	Dikte [4]	Al. aeq. [5]	
Gast.	♀	31	Links voor [6]	68	81,6 76,5 76,0 79,8 80,5	s = 2,5 m = 78,9 n = 5
v.E.	♂	52	Rechts voor [6]	90	92	
			midden [7]	80	91,2	s = 3,16
			achter [8]	87,5	87,4	m = 88,4
			Links voor	90	86,7	n = 5
			achter	95	84,9	
Zuid.	♂	87	Rechts voor	88	88,1	
			achter	88,5	90,5	s = 3,35
			Links voor	86,4	87,6	m = 90
			midden	81	95,6	n = 5
			achter	91	88	
Herm.	♀	47	Rechts voor	94	83	
			midden	91	91,1	s = 3,20
			achter	81	89,5	m = 88,7
			Links voor	92	89,3	n = 5
			achter	87	90,4	

1) s - Standaard spreiding
2) m - Gemiddelde
3) n - Aantal
4) Dikte - Dikte van het botslijppraeparaat in micra
5) Al. aeq. - Aequivalent van 100 micron bot uitgedrukt in micra aluminium. (S.G. aluminium 2,57)
6) Voor - $1\frac{1}{2}$ cm dorsaal van de spin. il. ant. sup.
7) Midden - $2\frac{1}{2}$ " " " " " " " "
8) Achter - $3\frac{1}{2}$ " " " " " " " "

De biopsieën werden genomen uit een gebied van 1 tot 3 cm dorsaal van de spina iliaca anterior superior. De meetuitkomsten van dit materiaal zijn eveneens vermeld in tabel 1. Bij gemiddelden van 88,4, 90,0 en 88,7 werden respectievelijk 3.16, 3.35 en 3.20 als standaarddeviaties gevonden.

IV. *Onderzoek van enkele factoren, die invloed kunnen hebben op de meetuitkomsten*

1. De plaats van de botbiopsie

Uit de gegevens van tabel 1 blijkt, dat kleine variaties in de plaats van de crista iliaca, waar de biopsie werd

genomen, de proefuitkomsten niet op systematische wijze beinvloeden. Een verhoging of een verlaging van het kalkgehalte, gaande van ventraal naar dorsaal, werd bijvoorbeeld niet gevonden. Of het verschil in standaarddeviatie tussen de uitkomsten van Pat. G. en van de andere drie patienten betekenis heeft, kan moeilijk worden gezegd. Volgens een statistische berekening (X-squaretest) verschilt de standaarddeviatie, gevonden bij patient G. significant van die, gevonden bij de overige drie patienten. Op grond van de grote overeenkomst tussen de gevonden standaarddeviaties bij de patienten E., Z. en H. lijkt het waarschijnlijk, dat de variaties, ontstaan door wisseling van de plaats van de biopsie, bij verschillende patienten van dezelfde grootte-orde zijn.

2. Fouten bij het meten van de dikte van het botslijppraeparaat

De dikte werd gemeten door de scherp afgesneden zijkanten van het botslijppraeparaat met behulp van een oculair micrometer onder het microscoop te meten. In het algemeen werden 25 à 30 diktemetingen langs de randen van het praeparaat verricht. Daar de fout van een meting ongeveer 2 micron bedraagt (Holmstrand, 1957; Wallgren, 1957), wordt de gemiddelde fout van 20-30 metingen zeer klein. De standaardfout van het gemiddelde bedraagt 0,4. Bij een praeparaat van 60 micron dik is de fout dus kleiner dan 1%.

3. Variaties in dikte in het botslijppraeparaat

In het algemeen kunnen door het gebruik van stalen geleideplaatjes bij het maken van de slijppraeparaten belangrijke diktevariaties voorkomen worden. Praeparaten met meer dan 5% verschil in dikte tussen de verschillende zijkanten werden niet gebruikt.

4. De dikte van het botslijppraeparaat

Ofschoon er geen redenen zijn om aan te nemen dat de dikte van het botslijppraeparaat invloed op de meetuitkomsten zou hebben, werden toch twee steekproeven genomen (zie tabel 2). De gevonden verschillen tussen dunne en dikke praeparaten kunnen geheel verklaard

worden door de proeffout, die inhaerent is aan de onderzoekmethode. Ook het onderzoek van het patientenmateriaal wijst niet op een invloed van de botslijpdikte die door ons werd gebruikt (28 tot 90 micron, tabel 14). Wél moet worden aangenomen, dat de nauwkeurigheid van de methode bij dikke praeparaten groter is dan bij dunne.

Tabel 2
Invloed van de dikte van het botslijppraeparaat op de uitkomsten van de quantitatieve microradiografie

Patient	Dikte in micra	Gem. al. aeq. van 100 bot
Fr.	30	84,3
	100	83,0
S. 308	28	78,5
	90	83,3

5. Variaties in dikte van het bot in het slijppraeparaat

Wanneer het kalkgehalte van een botgedeelte belangrijk beneden het gemiddelde was, werd microscopisch gecontroleerd of het slijppraeparaat door botweefsel van onderkant tot bovenkant was gevuld. Daar het onderscheid tussen bot en plastic, gebruikt voor het inbedden, microscopisch vaak moeilijk is, werd in enkele gevallen geen zekerheid verkregen. In twijfelgevallen werd het desbetreffende botgedeelte niet gemeten.

6. Randeffecten

Wanneer de lichtbundel van de photometer een „botbalkje" slechts gedeeltelijk raakt, wordt de indruk gewekt, dat het stukje bot een laag mineraalgehalte heeft. De vorm van de curve wijkt dan af van die welke bij een werkelijk laag kalkgehalte wordt gemeten, zodat hierdoor geen fouten behoeven te worden gemaakt. Ook op andere wijze ontstaan randeffecten. Doordat een botbalkje in het slijppraeparaat een schuin verloop heeft, wordt röntgenologisch de indruk gewekt van een laag kalkgehalte in de rand van het balkje. Ook deze afwijking is echter te onderscheiden van een werkelijk laag kalkgehalte.

7. De grootte van het aantal osteocyten

Bij de microphotometrie van het röntgenphototje kunnen de osteocyten niet als uitsparingen worden gemeten, omdat de gebruikte lichtbundel een doorsnede heeft van ongeveer 20 micron, terwijl een osteocyt slechts enkele micra groot is. De grootte van de osteocyten ten opzichte van het onderzochte bot werd niet gemeten. Bij microscopisch onderzoek blijken de osteocyten slechts een zeer klein gedeelte van het bot in beslag te nemen. Tussen patienten met hyperparathyreoidie en contrôlepersonen werden op het oog geen verschillen gezien.

8. Verontreinigingen in het bot

Door de biopsiemethode wordt het beenmerg verontreinigd met botzaagsel. In de photometercurve is dit echter gemakkelijk te onderscheiden van het overige bot.

9. Methylmetacrylaat in het bot

Daar het bot watervrij gemaakt wordt, is te verwachten, dat het methylmetacrylaat, dat gebruikt wordt voor het inbedden van het bot, de ruimte die door het water is achtergelaten, zal opvullen. Daar het watergehalte van bot ongeveer 11,5 gewichtsprocenten bedraagt (Neuman, 1953) en het soortelijk gewicht van bot ongeveer 2 bedraagt, moet worden aangenomen dat in het bot 20 vol.% water vervangen wordt door het plastic materiaal. Daar een 100 μ plastic laag aequivalent is aan 6 μ aluminium, zal het plastic dat zich in het bot bevindt, aequivalent zijn aan ongeveer 1,2 μ aluminium. Dit is dus zeer laag ten opzichte van het totaal aluminium aequivalent van het bot. Engström kwam proefondervindelijk tot dezelfde slotsom. Na het extraheren van het plastic bleek de röntgenabsorptie van het bot niet te zijn veranderd.

10. Onregelmatigheden in de röntgenbundel

Door het gebruik van twee aluminiumwiggen ter weerszijden van het praeparaat en door elke wig uit een reeks trappen te laten bestaan werden onregelmatigheden in de röntgenbundel met vrij grote zekerheid ontdekt. Door een goede centrering van het praeparaat in de bundel en door het kiezen van een grote afstand tot het focus van

de buis (25 cm) kon een gelijkmatig röntgenveld worden verkregen. De gelijkmatigheid van het röntgenveld werd regelmatig gecontroleerd door het photometreren van „blanco" röntgenopnamen.

11. Variatie in dikte van het aluminiumblad

Door bepaling van het gewicht per cm^2 van het gebruikte aluminiumblad werd gecontroleerd of het aluminiumblad gelijkmatig van dikte was. De uitkomsten zijn zo opgegeven, dat aluminium van 10 micron dik 0.2575 milligram per cm weegt.

12. Photografische plaat

Gebruikt werd Eastman Kodak 649-0 (oplossend vermogen 5000 lijnen per mm) of Kodak maximum resolutieplaat (oplossend vermogen 1000 lijnen per mm). De gelijkmatigheid van de emulsie werd enige malen gecontroleerd. Alleen aan de randen van de platen werden afwijkingen gevonden.

Samenvatting

1. Besproken werd de techniek van de quantitatieve microradiografie ter bepaling van het mineraalgehalte van het bot, waarbij aluminiumblad als vergelijkingsobject wordt gebruikt.
2. De standaardspreiding van de onderzoekmethode bedraagt ongeveer 3,2 bij een einduitkomst van 90.
3. Enkele factoren, die invloed kunnen hebben op de meetuitkomsten, werden besproken.

Hoofdstuk V

PHOSPHAATUITWISSELINGSPROEVEN IN VITRO

I. *Inleiding*

Met behulp van autoradiografie toonde Engfeldt in 1954 aan, dat radioactief gemerkt phosphaat in bot uit de omringende vloeistof in hoofdzaak wordt opgenomen in jonge structuren. Bovendien vonden deze onderzoekers dat deze opneming in vivo in dezelfde gebieden plaatsvindt als in dood bot in vitro.

Uitgaande van deze waarneming ligt het voor de hand aan te nemen, dat de opneming van phosphaat uit een oplossing in dood botweefsel in vitro als maat gebruikt kan worden voor de verhouding tussen de hoeveelheid jong bot en oud bot die aanwezig is in het te onderzoeken monster. Daar de opneming van phosphaat uit een oplossing in dood bot onder bepaalde omstandigheden voor een groot deel een uitwisselingsproces is, d. w. z. dat de phosphaat-concentratie van de oplossing tijdens de incubatieperiode nauwelijks verandert, is het niet mogelijk door chemische phosphaatbepalingen de reacties te volgen. Wanneer echter het phosphor uit de phosphaat oplossing wordt gemerkt met radioactief phosphor (^{32}P) kan - na een incubatieperiode - door bepaling van de specifieke activiteit van vloeistof en bot, de mate van uitwisseling worden gemeten.

Weikel, Neuman en Feldman (o. a. 1954) beschreven een techniek voor een phosphaatuitwisselingsproef in vitro. Deze techniek werd, mede op grond van de hierna volgende gegevens over de proeffout en over de invloed op de proefuitkomst van variaties in de voorwaarden, waaronder de proef werd uitgevoerd, zo gewijzigd, dat toepassing voor de bestudering van een klinisch probleem mogelijk werd.

II. *Beschrijving van de techniek van de phosphaatuitwisselingsproef*

Het door biopsie verkregen bot uit de crista iliaca, bestemd voor de phosphaatuitwisselingsproef, wordt met behulp van twee vijlen fijn gewreven onder 96% alcohol en hierin 24 uur bewaard. Vet en water worden geheel verwijderd door te extraheren met 96% alcohol, absolute alcohol en twee maal met aether. De extractieperioden bedragen steeds 1 uur. Hierna wordt het botpoeder gedroogd onder vacuum en gezeefd door een zeef met een maaswijdte van 100 micron. Botkorrels, die de zeef niet kunnen passeren, worden in een mortier fijngewreven en opnieuw gezeefd.

Van het verkregen botpoeder worden twee hoeveelheden van 10 mg afgewogen. In glazen buizen met ronde bodem en een diameter van 2.5 cm wordt aan het botpoeder 4 ml van een 0.005 molair-phosphaatoplossing toegevoegd. Deze phosphaatoplossing wordt bereid door een stamoplossing twintig maal te verdunnen. Deze stamoplossing wordt gemaakt door 120 ml van een KH_2PO_4-oplossing, bevattende 3.4 gram per 250 ml, toe te voegen aan 380 ml van een Na_2HPO_4-2aq-oplossing, bevattende 8.9 gram per 500 ml. De pH wordt met behulp van verdund zoutzuur of natronloog gecorrigeerd tot 7.3. Aan deze oplossing wordt radioactief gemerkt phosphaat toegevoegd, zodat 1 ml bevat 2×10^{-2} microcurie.

Vervolgens wordt het botpoeder met de gemerkte phosphaatoplossing gedurende 24 uur in een waterbad van 37°C geschud met een horizontaal schudmechanisme met een frequentie van 120 per minuut en een uitslag van 6 cm. Na afloop van de incubatietijd worden botpoeder en vloeistof van elkaar gescheiden door centrifugeren (2500/min., 1300 g) en decanteren. Het botpoeder wordt hierna gewassen met 10 ml gedestilleerd water. Na 10 minuten centrifugeren wordt opnieuw gedecanteerd. Het gedestilleerde water wordt toegevoegd aan de bij de vorige bewerking verkregen 4 ml phosphaatoplossing. Op deze wijze wordt 14 ml vloeistof verkregen.

Het botpoeder wordt door koken opgelost in 2 ml 3N zoutzuur en 12 ml gedestilleerd water wordt toegevoegd. Zowel in de vloeistof, verkregen van de phosphaatoplossing als in die verkregen van het botpoeder wordt de radioactiviteit in een vloeistoftelbuis gemeten (Veallbuis, 20th century Electr. type M 6). Bovendien wordt in

beide oplossingen chemisch het phosphaatgehalte gemeten volgens de methode van Subarrow en Fiske. Uit deze gegevens wordt het percentage van het botphosphaat uitgerekend, dat betrokken was bij het uitwisselingsproces. De berekening wordt gedaan alsof een evenwicht is bereikt, hetgeen niet geheel het geval is. (zie IV nr 11 van dit hoofdstuk).

Tenslotte wordt het uitwisselingspercentage, dat werd berekend, verder genoemd „absoluut percentage", uitgedrukt in procenten van het uitwisselingspercentage van een standaard botpoeder, dat bij iedere proef opnieuw wordt bepaald. Deze laatste waarde zal verder „relatief percentage" worden genoemd. Als standaard werd gebruikt een botpoeder in grote hoeveelheid bereid van sectiemateriaal. Het wordt droog bewaard bij nul graden Celsius.

Voorbeeld van een berekening

Stel de volgende gegevens:
phosphorgehalte van het bot: a mg
phosphorgehalte van de incubatievloeistof: b mg
aantal impulsen in de botoplossing: c/minuut
aantal impulsen in de incubatievloeistof: d/minuut
uitwisselings percentage van het standaard bot: f

Met deze gegevens is het mogelijk de volgende vergelijking op te stellen waarbij wordt uitgegaan van de veronderstelling dat de specifieke activiteit in het bot dat betrokken is bij het uitwisselings proces, gelijk is aan die in de vloeistof.
Stel dat het aantal mg botphosphor dat betrokken is bij de uitwisseling: x dan geldt

$$x : b = c : d$$

$$x = \frac{b.c}{d}$$

Wanneer x wordt uitgedrukt in procenten van het botphosphor dat totaal aanwezig is wordt dit $x = \frac{b.c}{d.a} \times 100$
Uitgedrukt in procenten van het standaard botpoeder

$$x = \frac{b.c}{d.a.f} \times 100$$

III. *De grootte van de proeffout*

Om een indruk te krijgen van de grootte van de proeffout werden de volgende proeven gedaan (zie ook tabel 3).

1. Standaard-botpoeder werd in eenzelfde proef 10 maal gemeten. Hierbij werd voor een gemiddelde van 100 een standaarddeviatie van 5 voor de duplobepalingen gevonden. In een volgende proef werd 6 maal „homogeen" botpoeder van patient P. gemeten. Hierbij werd voor een gemiddelde van „70" een standaarddeviatie van 3.5 gevonden.

2. In 17 verschillende proeven werd 17 maal „standaard" botpoeder in duplo gemeten. Bij een gemiddelde van 100 werd een standaarddeviatie van 5.9 gevonden. Dit onderzoek werd later nog eens herhaald: in 16 verschillende proeven werd 16 maal „standaard" botpoeder in duplo gemeten. Nu bedroeg de standaardspreiding 4.9.

In 19 proeven werd 19 maal de phosphaatuitwisseling bepaald van gehomogeniseerd botpoeder van pat. E. Bij een gemiddelde van 114.5 werd een standaarddeviatie van 4.5 gevonden.

3. Van 2 patienten werden post mortem botmonsters genomen uit 5 of 6 plaatsen van het voorste deel van de crista iliaca. Van al deze botmonsters werd in één proef de phosphaatuitwisseling bepaald. Bij een gemiddelde van achtereenvolgens 89.2 en 90.7 bedroegen de standaardspreidingen resp. 2.8 en 3.6.

4. Van één patient werden post mortem botmonsters genomen uit 6 verschillende plaatsen van de crista iliaca. Van deze botmonsters werd in 6 afzonderlijke proeven de phosphaatuitwisseling bepaald. Bij een gemiddelde van 100 bedroeg de standaardspreiding 4.4.

Tabel 3

Gegevens over de standaardspreiding van de phosphaat-uitwisselingsproef

Aard van de proef	Aantal proedagen	mg bot per bepaling	m	n	s
1. 5 x stand. bot	1	10	100	5	5
6 x Pat. P. (niet in duplo uitgevoerd)	1	10	70	6	3.5
2. 17 x stand. bot	17	10	100	17	5.9
16 x stand. bot	16	10	100	16	4.9
19 x Pat. E.	19	10	114.5	19	4.5
10 x stand. bot.	10	2.5	100.2	10	4.0
3. 5 x Pat. Her.	1	10	89.2	5	2.8
6 x Pat. Huls.	1	7	90.7	6	3.6
4. 6 x Pat. Vogel	6	10	100	6	4.4

m = gemiddelde, uitgedrukt in procenten van de standaard.
n = aantal proeven.
s = standaardspreiding.

Voorzover niet anders vermeld, werden alle proeven in duplo uitgevoerd. In de groepen 1 en 2 werd botpoeder gebruikt verkregen van een zelfde botmonster. In de groepen 3 en 4 werd botpoeder gebruikt afzonderlijk bereid van 5 of 6 botmonsters.

IV. *Bespreking van enkele factoren, die invloed kunnen hebben op de uitkomsten van de phosphaatuitwisselingsproef*

1. Verschuiving van phosphaat tussen vloeistof en bot

Door chemische analyse van de incubatievloeistof van de phosphaatuitwisselingsproef aan het begin en het eind van de proef toonden Falkenheim c. s. (1947) aan, dat er geen verschuiving plaats vindt van phosphaat tussen vloeistof en bot en dat er dus een uitwisselingsproces plaats heeft. Voor de proef werd 50 mg botpoeder gebruikt, geincubeerd in 25 ml 0.002 M phosphaat oplossing. Deze proef werd door ons herhaald onder de omstandigheden beschreven onder techniek (II hoofdstuk V), met 12 proefbuizen. In de buizen 1 tot en met 6 werd botpoeder en vloeistof vermengd en vervolgens van elkaar gescheiden. In de buizen 7 tot en met 12 werd het botpoe-

der gedurende 24 uur geincubeerd met de vloeistof en hierna werden botpoeder en vloeistof van elkaar gescheiden. De uitkomsten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 6.

Tabel 6

Phosphaat gehalte van bot en vloeistof bij begin en eind van de phosphaat uitwisselings proef

No buis	Phosphaat gehalte in microgram Phosphor				
	Na 0 uur incubatie		No buis	Na 24 uur incubatie	
	Vloeistof	Bot		Vloeistof	Bot
1	598	1075	7	564	1086
2	591	1091	8	568	1081
3	601	1086	9	571	1091
4	598	1091	10	568	1101
5	601	1066	11	568	1096
6	601	1086	12	568	1091
gemiddeld	599	1083		568	1091

Voor het bot bedroeg het phosphaat gehalte na „0" uur incubatie gemiddeld 1082 microgram met een gemiddelde afwijking van 8 en na 24 uur incubatie gemiddeld 1091 microgram met een gemiddelde afwijking van 5. Het verschil tussen deze twee groepen is niet significant. ($P > 0.05$). In de vloeistof bedroeg het phosphaat gehalte na „0" uur incubatie gemiddeld 599 microgram met een gemiddelde afwijking van 2.5, en na 24 uur incubatie gemiddeld 568 microgram met een gemiddelde afwijking van 1. Uit een statistische berekening, voorzover deze toegepast mag worden op deze kleine aantallen, volgt dat het verschil tussen deze twee groepen significant is ($P < 0.001$).

Ook bij proeven waarbij de uitwisseling van het phosphaat van het bot tegen dat van de vloeistof in de tijd werd gevolgd bleek het phosphaat gehalte van de vloeistof na 24 uur incubatie lager te zijn dan na 1 uur incubatie en wel ongeveer 50 microgram in een proef met bot van een controle persoon en ongeveer een zelfde hoeveelheid in een proef met bot van een kalf. In deze proeven werd een lichte stijging van het phosphaat gehalte van het bot gevonden met de duur van de incubatie.

Wij hebben grote moeilijkheden gehad om de vermin-

dering van het phosphaatgehalte van de vloeistof te verklaren, met name omdat het phosphaat gehalte van het bot tennaaste bij het zelfde blijft, of slechts een lichte stijging vertoont.
De gedachte dat absorptie aan het glas de oorzaak zou kunnen zijn van het verdwijnen van phosphaat uit de vloeistof kon worden tegen gesproken doordat uit een proef bleek dat wanneer het phosphaat van vloeistof en bot gezamenlijk wordt bepaald, zonder eerst te scheiden, na 0 uur en na 24 uur incubatie gelijke uitkomsten werden verkregen. Ook het phosphaat gehalte van de vloeistof, zonder botpoeder geschud, bleek na „0" uur schudden en na 24 uur schudden hetzelfde te zijn. Uit een steekproef met 10 proefbuizen waarvan de vloeistof bij vijf „0" uur en bij de overige vijf 24 uur in contact was geweest met botpoeder van een zelfde monster kregen wij de indruk, dat het phosphaat gehalte van de vloeistof, na opkoken met zoutzuur na „0" uur en na 24 uur gelijk is (zie tabel 6a). Dit dus in tegenstelling tot de proef waarbij niet met zoutzuur werd gekookt (zie tabel 6).

Tabel 6a

Phosphaat gehalte van de vloeistof, na incubering met botpoeder, in microgrammen Phosphor, na koken met zoutzuur

No buis	Na „0" uur	No buis	Na 24 uur incubatie
1	620	6	642
2	624	7	642
3	652	8	---
4	632	9	642
5	650	10	624
gemiddeld	636		637

Dit zou kunnen worden verklaard door aan te nemen dat na 24 uur incubatie botkristallen zijn gesuspenseerd in de vloeistof en met het centrifugeren niet worden neergeslagen. Deze kristallen gaan bij het decanteren over naar de vloeistof buis.
Het phosphaat van deze kristallen wordt bij de gebruikelijke phosphaat bepaling niet meebepaald. Wanneer de vloeistof echter voor de phosphaat bepaling met zoutzuur wordt gekookt, lossen de botkristallen op en dragen bij

tot het phosphaat gehalte van de vloeistof. Het ontbreken van een daling van het phosphaat gehalte van het bot zou kunnen worden verklaard door aan te nemen dat het botpoeder tijdens de incubatie periode phosphor opneemt uit de incubatie vloeistof.
Wanneer deze veronderstelling juist is betekent dit dat ongeveer 10% van de phosphaat „uitwisseling" die wordt bepaald geen uitwisseling doch opname is.

Bij de bespreking van de toepassing van de phosphaatuitwisselingsproef op bot van patienten en op bot van controle personen zal eveneens blijken dat de uitwisseling die werd bepaald, slechts voor een deel werkelijke uitwisseling is, terwijl voor een ander deel opname van phosphaat uit de vloeistof in het bot verantwoordelijk is.

Daar de nauwkeurigheid van het meten van het phosphaat in bot en vloeistof niet toestaat in ieder individueel geval uitwisseling en opname afzonderlijk te bepalen zal steeds de som van deze twee worden opgegeven. Daar van het phosphaat van de vloeistof dat zich na afloop van de phosphaatuitwisselingsproef in het bot bevindt, slechts een klein deel door opname, naar schatting 10 tot 20%, en een groot deel door uitwisseling, naar schatting 80 tot 90%, is verplaatst zal het woord uitwisseling worden gebruikt om beide processen gezamenlijk aan te duiden.

2. Concentratie van de phosphaatoplossing

In de literatuur wordt opgegeven, dat de phosphaationen concentratie van de incubatievloeistof weinig invloed heeft op de uitwisselingssnelheid van bot (Falkenheim, c.s. 1947; Neuman c.s. 1958; Weikel c.s., 1954). De getallen, die genoemde onderzoekers geven, hebben echter in het algemeen betrekking op phosphaatconcentraties lager dan de door ons gebruikte concentratie van 0.005 molair. Uit enkele door ons gedane proeven kregen wij de indruk, dat toeneming van de vloeistofconcentratie een verhoogde uitwisseling tengevolge heeft (zie tabel 4).

Tabel 4

Gegevens over de invloed van de concentratie van de phosphaatoplossing op de uitkomst van de phosphaatuitwisselingsproef

Conc. P-oplossing	Datum	Uitwisselingspercentages Abs.	Rel.
0.005 molair	26-8-'55	18.4%	
0.010 "		20.0%	
0.015 "		21.9%	
0.003 "	15-7-'57	29.0%	102%
0.005 "		29.6%	104%
0.010 "		32.4%	114%

3. De verhouding tussen het aantal mg bot en het aantal ml vloeistof

Uit literatuurgegevens blijkt, dat de verhouding tussen hydroxy-apatite en de hoeveelheid incubatievloeistof het uitwisselingsproces beïnvloedt (Weikel, c. s. 1954). In de door ons gedane proeven werd daarom de verhouding tussen het aantal mg botpoeder en het aantal cm^3 incubatievloeistof constant gehouden.

4. De zuurgraad van de vloeistof

Verschillen in de zuurgraad van de phosphaatoplossing hadden weinig invloed op de uitkomsten van de phosphaatuitwisseling (zie tabel 5).

Tabel 5

Invloed van pH-veranderingen van de incubatievloeistof op de uitkomsten van de phosphaatuitwisselingsproef

standaard 10 mg	pH-vloeistof	P-uitw. Abs.	Rel.
15-7-'57	6.8	29.6	104
	7.3	28.5	100
	7.8	28.7	101

Uit de bepaling van de pH van de phosphaatoplossing vóór en na de proef bleek, dat de verandering tijdens de proef minder dan 0.1 bedroeg.

5. Verdamping tijdens de proef

Door weging van de proefbuizen vóór en na incubatie werd aangetoond, dat tijdens de proef geen verdamping optreedt.

6. Bacterie- en schimmelgroei in de phosphaatoplossing

In één proef werd tijdens de incubatieperiode een schimmelgroei gezien. Deze schimmels bevatten geen meetbare hoeveelheden ^{31}P en ^{32}P.

7. Gehalte van ^{32}P van de wasvloeistof

Wanneer het botpoeder na incubatie niet één doch twee maal werd gewassen met 10 ml gedestilleerd water, bleek de oorspronkelijke phosphaatoplossing 68%, de eerste wasvloeistof 3.3% en de tweede wasvloeistof 1.3% van het toegevoegde ^{32}P te bevatten. Gezien de grootte van de totale proeffout meenden wij de tweede wassing achterwege te kunnen laten.

8. Korrelgrootte van het gebruikte bot

a. Ofschoon in de literatuur wordt opgegeven, dat de korrelgrootte geen invloed heeft op de uitkomsten van de PO_4-uitwisselingsproef (Falkenheim, c.s. 1947, Lefevre, c.s. 1939), wekken enkele steekproeven de indruk, dat de korrelgrootte wel van betekenis is (zie tabel 7).

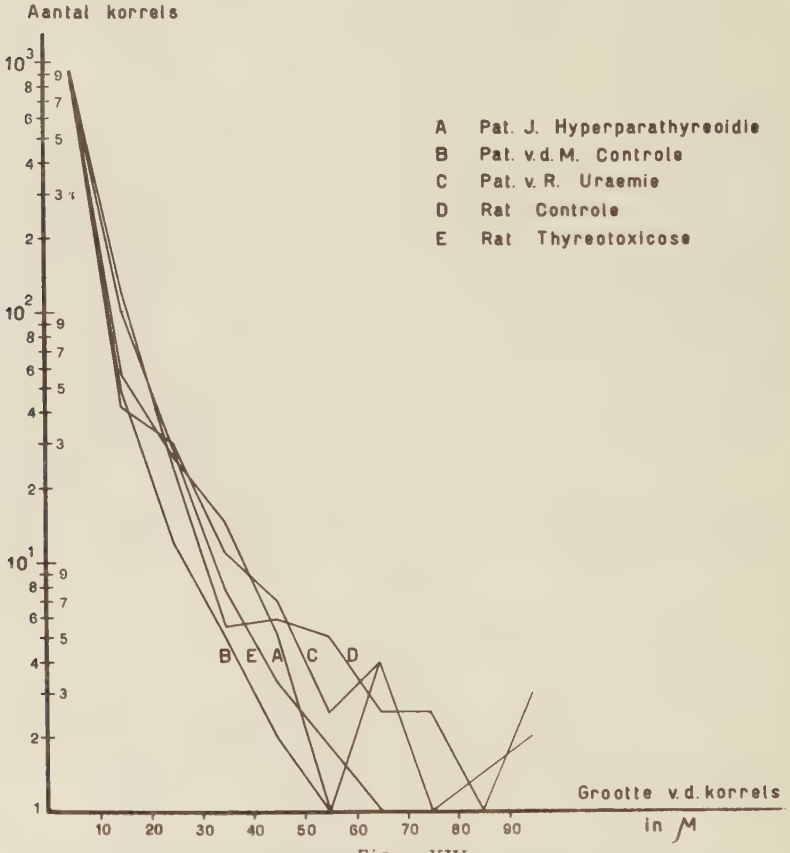
Tabel 7

Invloed van de botkorrelgrootte op de phosphaatuitwisseling

Korrelgrootte	Datum 29-8-'57		Datum 14-9-'56	
	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.
<105μ	28.7%	100%	30%	100%
105μ - 212μ	25.9%	87%	27%	90%
300μ - 710μ	23.9%	83%	24%	80%

Teneinde de grootte van de botkorrels enigszins constant te houden, werd bij de standaarduitvoering van de phosphaatuitwisselingsproef het botpoeder gezeefd door een zeef met een maaswijdte van 100 micron.

b. De korrelgrootte van botpoeder van drie patienten en van twee ratten werd na zeving met behulp van microscoop en oculairmicrometer gemeten. De verdeling van de korrels over de verschillende grootte-klassen lijkt in alle hetzelfde (zie fig. XIV). Opgemerkt dient te worden, dat uiteraard geen oordeel kan worden gegeven over korrels, wier grootte beneden het oplossend vermogen van de microscoop ligt.



Figuur XIV

Van het botpoeder van elk van vijf botmonsters werd de doorsnede van 1000 korrels gemeten met behulp van het microscoop. De verdeling van het aantal korrels naar grootte wordt in de figuur grafisch weergegeven.

9. Selectie tijdens het maken van het botpoeder

Botpoeder, dat bij de eerste behandeling in grove korrels was verdeeld, werd in een mortier fijngewreven tot een korrelgrootte kleiner dan 100 μ. Dit poeder werd in de phosphaatuitwisselingsproef vergeleken met poeder, dat reeds bij de eerste behandeling door de fijne zeef doorgelaten werd. De gevonden absolute uitwisselingspercentages bedroegen resp. 31 en 30.

10. Keuze van de plaats van de crista-biopsie

Van verschillende plaatsen van het voorste deel van de crista iliaca werd post mortem materiaal verkregen en in enige proeven vergeleken (zie tabel 8). De standaardspreidingen liggen in dezelfde grootte-orde als die, welke werden vermeld in het eerste en tweede deel van tabel 3.

Tabel 8

Invloed van variaties in de plaats van de crista iliaca-biopsie

	Plaats biopsie	mg bot	P. uitw.		
			Abs.	Rel.	
	Rechts vóór	10	35.0		
Pat. X.	Rechts midden	10	33.0		
	Links vóór	10	34.0		
	Rechts vóór	10	26.6	90	
Pat. He.	Rechts midden	10	24.9	85	m = 89.2
6-1-'58	Rechts achter	10	27.2	92	n = 5
	Links vóór	5.7	26.7	88	s = 2.8
	Links midden	10	27.0	91	
	Rechts vóór	4.2	29.0	97	
	Rechts midden	6.7	26.7	89	m = 90.7
Pat. Hu.	Rechts achter	7.7	25.1	86	n = 6
30-1-'58	Links vóór	6.4	27.4	91	s = 3.6
	Links midden	5.2	27.4	91	
	Links achter	8.5	26.3	90	
	Rechts vóór	10.0	27.0	96.5	
	Rechts midden	10	28.8	104	m = 100
Pat. V.	Rechts achter	10	29.4	95	n = 6
10-4-'58	Links vóór	10	29.2	106	s = 4.4
	Links midden	10	27.2	100	
	Links achter	10	27.5	98	

vóór : $1\frac{1}{2}$ cm dorsaal van de spina iliaca anterior superior.
midden: $2\frac{1}{2}$ " " " " " " " "
achter : $3\frac{1}{2}$ " " " " " " " "

m = gemiddelde.
n = aantal bepalingen.
s = standaardspreiding.

Hieruit volgt, dat variatie in de plaats van de biopsie geen belangrijke verandering in het uitwisselingspercentage veroorzaakt.

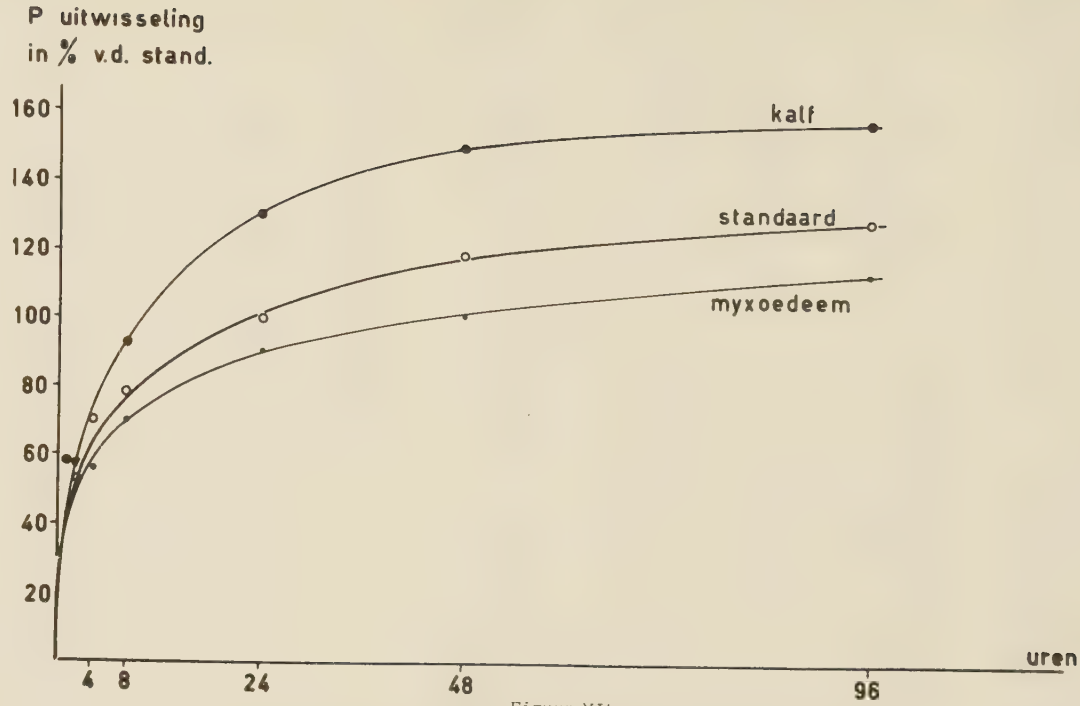
11. Duur van de incubatie

Om tot een juiste keuze van de incubatietijd te komen, zou het nodig zijn het uitwisselingsproces van bot van patienten met hyperparathyreoidie in de tijd te volgen en te vergelijken met overeenkomstige gegevens van normaal bot. De hoeveelheid beschikbaar bot van patienten met hyperparathyreoidie stond een dergelijk onderzoek echter niet toe. In plaats van bot van een patient met hyperparathyreoidie werd daarom bot van een pas geboren kalf gebruikt. Vermoedelijk is dit, gezien het hoge gehalte aan jong bot, vergelijkbaar met bot van een patient met hyperparathyreoidie. Hiernaast werd tegelijkertijd een proef met standaardbotpoeder uitgevoerd en tevens een proef met bot met een laag uitwisselingspercentage, dat post mortem verkregen was van de crista iliaca van een patient met hypothyreoidie. In figuur XV zijn de resultaten van dit onderzoek grafisch uitgezet. Uit de curven blijkt, dat het verschil in uitwisseling tussen het bot van de patient met hypothyreoidie, het standaardbot en het bot van het kalf, met uitwisselingspercentages na 24 uur van resp. 90 100 en 130 en na 96 uur van resp. 113, 128 en 157, nauwelijks verandert na 24 uur. Er van uitgaande dat het bot van het pasgeboren kalf vergelijkbaar is met dat van een patient met hyperparathyreoidie, werd bij de standaarduitvoering van de phosphaatuitwisselingsproef 24 uur als incubatieperiode gekozen.

Bij de keuze van de incubatietijd speelde ook de overweging een rol, dat het voor de hand ligt verschillen tussen bot van normale personen en van patienten met hyperparathyreoidie te zoeken in processen, die zich aan het oppervlak van het botkristal afspelen. In een uitwisselingsproef zullen deze vooral in de eerste 12 uur van de proef hun invloed doen gelden.

12. Schudmechanisme

Door opvoeren van de schudfrequentie van 120 per minuut tot 140 per minuut steeg de phosphaatuitwisseling van 29% tot 32%. Bij verhoging van de frequentie van 140 per minuut tot 200 per minuut werd geen verschil gevon-



Figuur XV

Het verloop van de phosphaatuitwisseling in botpoeder met een hoog, een gemiddeld en een laag uitwisselingspercentage in de tijd. Als standaard-incubatietijd werd 24 uur gekozen.

den. Weikel c. s. (1954) vond geen invloed van wijzigingen van het toerental van het door hen gebruikte roermechanisme op de phosphaatuitwisseling. Vermoedelijk geeft het door hen gebruikte roermechanisme echter een betere menging dan het door ons gebruikte schudmechanisme.

13. Tijd post mortem

Uit studies met behulp van autoradiografie blijkt, dat de opnemingen van radioactieve isotopen in bot tijdens het leven, direct na de dood en na droog bewaren gelijk is (Amprino, 1952).

Daar in de controlegroep veel patienten voorkomen, bij wie de botbiopsie post mortem werd verricht, lijkt deze waarneming van Amprino van het grootste belang voor de beoordeling van het verrichte onderzoek. In een proef met bot van ratten, 0 uur en 24 uur post mortem verkregen, vonden wij met de phosphaatuitwisselingsproef in vitro gelijke uitwisselingswaarden. (zie tabel 9).

Tabel 9

Vergelijking van de PO_4-uitwisseling van botmengsels van de diaphysen van rattenfemora, 0 uur en 24 uur post mortem verkregen, uitgedrukt in relatieve en absolute procenten.

	Phosphaat-uitwisseling in procenten			
	0 uur p. m.		24 uur p. m.	
	rel.	abs.	rel.	abs.
	78	20.6	75	19.8
	82	21.6	75	19.8
	79	20.7	79	20.8
	72	19.0	79	20.7
	78	20.5	79	20.9
gemiddeld	78	20.5	77	20.4

Ook bot van de crista iliaca van een mens, 0 uur en 24 uur post mortem verkregen, gaf gelijke uitkomsten in de phosphaatuitwisselingsproef (zie tabel 10).

Tabel 10

Vergelijking van de phosphaatuitwisseling van botpoeder van de rechter en van de linker crista iliaca van een mens 0 uur en 24 uur post mortem verkregen, uitgedrukt in procenten (absoluut).

	Phosphaatuitwisseling in procenten (abs) 0 uur post mortem		24 uur post mortem	
Botpoeder van de R. crista iliaca	23.8 23.9	m = 23.8	23.0 22.8 23.5	m = 23.3
Botpoeder van de L. crista iliaca	23.4 23.0 23.6	m = 23.1	22.3 24.8 24.8	m = 24.0

14. Invloed van het aantal mg botpoeder op de nauwkeurigheid van de proef

Uit tabel 3 blijkt, dat de standaardspreiding bij gebruik van $2\frac{1}{2}$ mg botpoeder van het standaardpraeparaat 4 bedroeg, terwijl bij het gebruik van 10 mg botpoeder 4.5 werd gevonden. Ook bij het gebruik van zeer kleine hoeveelheden botpoeder lijkt de proefuitkomst reproduceerbaar.

15. Verontreiniging van het bot met kraakbeen

Tabel 11

Phosphor gehalte en phosphaat uitwisseling van kraakbeen

Hoeveelheid kraakbeen	Sectie no	phosph. uitw. Abs.	Rel.	P per 10 mg kraakbeen in γ
10 mg	59-57	41.9	151	24.7
10 mg 6-4-'57	60-57	41.0	148	35.0
10 mg	62-57	42.6	154	20.0

Uit tabel 11 blijkt, dat kraakbeen een hogere phosphaat uitwisseling heeft dan bot. Bij het onderzoek van bot van de crista iliaca van kinderen treden verontreinigingen van het bot met kraakbeen op, ondanks de pogingen bij het praepareren van het bot het kraakbeen zoveel mogelijk te verwijderen. Een grote invloed op de proefuitkomst heeft dit echter niet omdat het phosphaat gehalte van kraakbeen per gram slechts 1/20 bedraagt van dat

van bot. Wanneer een botmonster zeer sterk verontreinigd zou zijn en bijvoorbeeld 10% kraakbeen zou bevatten, geeft dit slechts een fout van een 1/2 procent.

Samenvatting

1. Besproken werd een techniek voor een uitwisselingsproef in vitro van botpoeder met een phosphaat oplossing, waarvan het phosphaat met ^{32}P werd gemerkt.

2. Factoren, die invloed hebben op de uitkomsten van de proef, zoals concentratie van de phosphaatoplossing, de zuurgraad van de oplossing, de korrelgrootte van het botpoeder, de plaats van de biopsie uit de crista iliaca, de duur van de incubatie, werden onderzocht en besproken.

3. Waarschijnlijk is 10 tot 20% van de phosphaat uitwisseling, die wordt berekend geen uitwisseling, doch opname van phosphaat uit de vloeistof in het bot.

4. De standaardspreiding van de methode bedraagt ongeveer 4 bij een eind uitkomst van 100%.

Hoofdstuk VI

KLINISCHE GEGEVENS

I. *Inleiding*

De methoden voor microradiografie en phosphaatuitwisseling, die in de voorafgaande hoofdstukken werden beschreven, zijn toegepast bij een reeks van 17 patienten met hyperparathyreoidie en ter vergelijking bij 17 controlepersonen en 5 patienten met hypercalcaemie, welke niet veroorzaakt werd door hyperparathyreoidie. Ook werd bij 2 patienten, bij wie met goed gevolg een bijschildklieradenoom werd verwijderd, later het onderzoek herhaald.

II. *Klinische gegevens van de patienten met hyperparathyreoidie*

Het is hier niet de plaats een beschrijving te geven van de variaties, die in het klinische beeld van de hyperparathyreoidie kunnen worden aangetroffen. Hiertoe wordt verwezen naar de standaardwerken over dit onderwerp, zoals: The parathyroid glands and metabolic bone disease, door F. Albright en E. C. Reifenstein Jr (1948) en Medical clinics on bone disease; door I. Snapper (1957). Volstaan zij slechts met de mededeling, dat het ziektebeeld zich in drie vormen kan voordoen. De meest frequent voorkomende vorm is die, waarbij recidiverende nierstenen worden gevonden. In de tweede plaats kunnen de afwijkingen van het skelet op de voorgrond staan en ten slotte kan het biochemisch syndroom van hypercalcaemie, dat gekarakteriseerd wordt door braken en polyurie, het ziektebeeld beheersen.

Voor de diagnostiek werden aanvankelijk uitsluitend de serumcalciumwaarden als criterium voor een verhoogde bijschildklierfunctie gebruikt. De differentiaal diagnose moest worden gemaakt met andere ziekten, die eveneens aanleiding kunnen geven tot hypercalcaemie, terwijl bovendien het eiwitgehalte van het serum bij de waardering

van de calciumwaarden mede in beschouwing moest worden genomen. Reeds spoedig werd hieraan als diagnostisch hulpmiddel toegevoegd de bepaling van het anorganische phosphaatgehalte van het serum en de bepaling van de uitscheiding van calcium in de urine, terwijl de patient een dieet gebruikt dat weinig calcium bevat. Ook deze methoden gaven niet altijd bevredigende resultaten, omdat de verlaging van het anorganische phosphaatgehalte gecompenseerd kan worden door een gestoorde nierfunctie, die het anorganische phosphaatgehalte doet stijgen. Verder bleek, dat infecties der urinewegen aanleiding kunnen zijn tot een verhoogde calciumuitscheiding in de urine bij een kalkarme voeding. Ook de bepaling van het alkalische phosphatasegehalte van het serum bleek in bepaalde gevallen van hyperparathyreoidie van belang voor de diagnostiek, met name, wanneer botafwijkingen werden gevonden. Kort geleden heeft men, opnieuw uitgaande van de gedachte, dat parathormon op de nier werkt, gemeend in de terugresorptie van phosphaat door de niertubuli een criterium voor de werking van parathormon te kunnen vinden (Nordin en Fraser, 1956).

Bij de beschrijving van de patienten met hyperparathyreoidie zijn de uitkomsten van de bovengenoemde laboratorium onderzoekingen vermeld. Voor de calcium bepaling in het serum werd aanvankelijk gebruik gemaakt van de methode volgens Clark en Collip (1925), later van een complexon methode (Gorter en de Graaff 1955). Een uitkomst van 11 mg% of hoger werd als afwijkend beschouwd. De bepaling van het anorganisch phosphaatgehalte van het serum werd verricht volgens de methode van Briggs (1922). Als ondergrens van het normale werd 2.7 mg% aangenomen. Het alkalische phosphatasegehalte van het serum werd bepaald volgens een gewijzigde methode van Bodansky (Neumann, 1952). Waarden hoger dan 5 eenheden werden als afwijkend beschouwd. De calcium uitscheiding met de urine werd gedurende drie dagen gemeten terwijl de patient met een inloopperiode van drie dagen een dieet gebruikte, dat 200 mg calcium en 700 mg phosphor bevatte. Met het calcium gehalte van het drinkwater werd rekening gehouden.

De nierfunctie werd als volgt nagegaan:

a. Het hoogste soortelijke gewicht, bepaald bij kamertemperatuur, van de urine werd opgegeven. Daar bij de meeste patienten geen concentratieproef werd verricht, kan uit het vinden van lage waarden geen conclusie wor-

den getrokken. De hoge waarden wijzen op een normale nierfunctie.
b. De phenolrood proef werd opgegeven als percentage van de intra veneus ingespoten hoeveelheid phenolsulfophtaleine, die werd uitgescheiden in een uur. Als grens van het normale werd 50% aangenomen.
c. De urea clearance werd als een maximum clearance uitgevoerd. Van twee perioden van een uur, werd het gemiddelde opgegeven in procenten van het normale. Uitkomsten lager dan 70% werden als pathologisch beschouwd.
d. De endogene creatinine clearance werd tegelijkertijd met de urea clearance gemeten. Bij de bepaling (Bonsness c.s. 1945) werd geen correctie aangebracht voor serum chromogenen.

De phosphaat clearance van de nieren werd nuchter bepaald, nadat de patient drie dagen een dieet had gehouden dat 200 mg calcium en 700 mg phosphor bevatte. De phosphaat uitscheiding in de urine werd uitgedrukt in een index getal (Nordin en Fraser, 1956) volgens de formule:

$$\text{P index} = \frac{\text{Pcl}}{\text{Cr.cl}} - \frac{\text{Ser.P}}{20} + 0.05.$$

Waarin: P.cl = phosphaat clearance in cc per minuut.
Cr.cl = creatinine clearance in cc per minuut.
Ser.P = serum phosphaat in mg P%.

De grens van het normale voor dit index getal ligt bij 0 ± 0.12.

1. De gegevens van de 17 patienten met hyperparathyreoidie die werden onderzocht, zijn opgenomen in tabel 12. De leeftijd van de patienten varieert van 19 jaar tot 74 jaar. De voorkeur van de ziekte voor het vrouwelijke geslacht zoals in een literatuuroverzicht van B. Marden Black c.s. (1956) werd vastgesteld, blijkt niet uit onze serie. De duur van de ziekte, beoordeeld naar anamnestische gegevens, varieerde in onze serie van enkele maanden tot 9 jaar. In hoeverre deze gegevens in overeenstemming zijn met de werkelijke duur van de ziekte kan hieruit niet worden afgeleid.

Slechts bij twee patienten werd het ziektebeeld beheerst door skeletafwijkingen (No. 1 en 9). Beide patienten

hadden anamnestisch een aanval van buikpijn gehad, die mogelijk op een niersteenkoliek terug te voeren is. Een bewijs hiervoor kon echter niet worden geleverd.

Bij 14 patienten stonden aandoeningen van de tractus urogenitalis op de voorgrond (no. 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 en 17).

Een patient (nr 3) toonde het klinisch beeld van de hypercalcaemie. Bij patient nr 15 bestond een ernstige uraemie, waardoor het moeilijk met zekerheid te zeggen is, of de verschijnselen van misselijkheid en braken op de hypercalcaemie zijn terug te voeren.

Het serumcalcium gehalte van alle patienten werd gemiddeld te hoog gevonden. Bij één patient werden enige weken achtereen normale calciumwaarden gevonden (nr 13).

Het gehalte van het serum aan anorganisch phosphaat was bij 13 patienten gemiddeld verlaagd. De serum phosphaat waarden van 4 patienten waren gemiddeld niet verlaagd. Bij 8 patienten werden incidenteel waarden gevonden die niet verlaagd waren (nr 5, 6, 7, 11, 12, 13, 15 en 16). Vijf van deze patienten hadden een gestoorde nierfunctie (nr 5, 11, 13, 15 en 16). Van de vier patienten met een gemiddeld niet verlaagd serumphosphaat gehalte hadden er twee een gestoorde nierfunctie (nr 15 en 16). Van de 17 patienten hadden er dus twee een gemiddeld normaal serumphosphaat gehalte terwijl de nierfunctie ongestoord was.

Het alkalisch phosphatase gehalte van het serum was bij 11 patienten verhoogd (nr 1, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 en 17). Bij 6 van deze patienten werden botafwijkingen gevonden (nr 1, 6, 9, 14, 15 en 16). Bij 6 patienten werd een normaal alkalisch phosphatase gehalte gevonden.

De urine calcium uitscheiding per 24 uur tijdens het gebruik van een calciumarm dieet was in 14 gevallen verhoogd. De drie gevallen met een normale calciumuitscheiding (nr 13, 15 en 17) hadden een gestoorde nierfunctie.

De diastolische bloeddruk - 85 mm kwik werd als grenswaarde aangenomen - was bij 10 patienten verhoogd (nr 1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 16 en 17). Alle patienten met een gestoorde nierfunctie hadden, uitgezonderd nr 13 een verhoogde bloeddruk.

De nierfunctie werd als normaal opgegeven, wanneer óf de ureaclearance óf de creatinineclearance voldoende waren. In geval 1 en 7 wordt de uitspraak van een nor-

male nierfunctie niet gesteund door de phenol rood proef. In geval 10 werd op grond van de urine concentratie en op grond van de phenol rood proef tot een normale nierfunctie besloten, ofschoon de clearance-onderzoekingen op een lichte stoornis wezen. Bij 8 patienten werd een gestoorde nierfunctie gevonden (nr 3, 5, 9, 11, 13, 15, 16 en 17).

Van de 13 patienten, bij wie een phosphaatexcretie index werd bepaald werden 9 waarden gevonden hoger dan 0.12 (nr 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12, 13 en 17), terwijl bij 4 patienten een normale waarde werd gevonden (nr 4, 8, 10 en 15).

Van de 4 patienten met een normale waarde hadden er 3 een normale nierfunctie (nr 4, 8 en 10). Phosphaatretentie door een nierbeschadiging kan in deze gevallen niet de oorzaak geweest zijn van het normaal uitvallen van het indexgetal.

Röntgenafwijkingen werden slechts bij 5 patienten met zekerheid vastgesteld (nr 1, 9, 14, 15 en 16), terwijl bij patient nr 3 een licht onregelmatige begrenzing van de cortex van de vingerkootjes op de röntgenphoto werd gezien.

Histologisch onderzoek van het bot werd bij 16 patienten verricht. Slechts bij 2 (nr 6 en 15) werden afwijkingen vastgesteld.

Bijschildklier-operatie werd verricht bij alle patienten. Bij twee werd geen bevredigend resultaat verkregen. Bij patient nr 4 werd bij de operatie geen exploratie van het mediastinum verricht en patient weigerde hernieuwde operatie. Bij patient nr 8 werd ook na volledige exploratie geen bijschildklieradenoom gevonden. Wat de laatste patient betreft, dient vermeld te worden, dat reeds vóór patient onder onze behandeling kwam een poging was gedaan een bijschildklieradenoom te vinden. Hierdoor werd de operatie technisch zeer bemoeilijkt.

2. Bij twee patienten, die met succes werden geopereerd voor een hyperparathyreoidie (nr 1 en 15 van tabel 12), werd na de operatie opnieuw een biopsie van de crista iliaca verricht. Patient nr 1 was op het ogenblik van de tweede biopsie, drie jaar na de bijschildklieroperatie, geheel gezond. De tweede biopsie bij patient nr 15 werd 1 jaar na de operatie verricht, nadat patient was overleden aan een nierinsufficiëntie.

Tabel 12

Overzicht van de gegevens van 17 patienten met hyperparathyreoidie

No	Naam	Nr van de ziekte geschiedenis	Leeft. in jaren	Gesl.	Duur v.d. ziekte in jaren	Klinisch beeld	serum calcium in mg.%	serum phosphaat in mg. P %	Alk. phosphatase Bodansky E.	Urine Calc. mg/24 uur.
1	A.E.-S.	End. A 154/56	19	♂	¼	botafw. nier-steenkoliek?	16 15,2-17,4	2.2 1,9-2,5	16 15-23	500
2	B.H.-K.	End. B 320/56	19	♂	3	nierstenen	14 13,7-15	2.1 1,8-2,3	4,9	260
3	W.-v.G.	End. C 195/57	19	♂	½	gastro intest.	16 15,4-16,8	1,6	4,2	300
4	J.-H.	End. B 221/56	31	♂	8	nierstenen	13 12,8-13,3	2,2 2,2-2,3	4,1	320
5	H.-d.L.	End. Pk. 6174/58	31	♂	10	nierstenen	14,2 13,7-14,9	2,4 2,1-3,3	3,0	240
6	P.J.J.-K.	End. Pk. 6099/57	35	♂	9	nierstenen	14 13,4-15,1	2,1 1,7-3,9	6,9	350
7	E.A.-P.	End. Pk. 1338/56	40	♀	8	nierstenen	14 11,4-15,2	3 2-5,8	5,9 6,4-4	380
8	L.-J.	End. Pk. 6078/56	41	♀	3	nierstenen	12 11-12,5	2 1,3-2,4	3	201
9	F.J.-v.V.	End. Pk. 6473/57	52	♀	½	botafw. nier-steenkoliek?	12	2 2-2,2	11	500
10	A.H.	End. Pk. 6436/56	59	♀	4	nierstenen	14 13,6-14,2	2,3	5,7	600
11	E.J.-v.E.	End. Pk. 6456/57	59	♀	6	nierstenen	12 11,7-13,2	3 2,8-3,4	8,0	270
12	A.-H.	End. C 348/57	60	♀	6	nierstenen	11,7 11,5-11,9	2,5 1,9-2,8	3,4	280
13	L.-v.G.	End. B 390/56	61	♂	6	nierstenen	11,5 10,7-13,6	2 1,6-3,0	5,5	110
14	G.-v.L.	End. Pk. 6455/57	61	♂	4	nierstenen botafw. misselijkh. botpijn uri-weg infecties	13,4 13 12,8-14,4	2,6 5 3,3-5,6	15 21	600 100
15	L.H.-H.	End. Pk 6507/57	66	♀	6	urineweg in-fecties osteoporose cystitis epulis	14,9 12,5 12-13	4,4 2,1 2,1-2,2	7,3 7,5	300 70
16	A.H.-d.W.	End. Pk. 6471/57	73	♂						
17	E.-v.d.J.	End. Pk. 6037/57	74	♀	3					

Bloeddruk	Spont. max. s. g. urine	P. S. P. na 1 uur	C_m ureum in %	Creat clear. in cc/m	nier-functie	PO_4 clear. ml/m	phosph. index	Röntg. afw.	Hist. bot	Op.	serum calc. in mg.% 1 week na operatie
135/90	1014	46	63	140	+	29	0.16½	+	-	+	8.8
125/90	1019	56	95	30?	+	20	0.60	-	-	+	9.8
170/135	1009		43	62	-	18	0.26	sp	-	+	10.6
150/75	1022	78	113	133	+	19	0.07	-	-	-	12
160/100	1020		36		-			-	-	+	9.8
140/85	1018		68	117	+	30	0.19	-	+	+	9.7
130/85	1018	43	70	83	+	22	0.25	-	-	+	9.7
150/95	1021	66	87	96	+	14	0.05	-	-	-	11.2
200/110		44	50	91	-	23	0.19	+	-	+	9.6
170/110	1020	71	60	85	+	13.3	0.11	-	-	+	10.2
140/90	1017		40		-			-	-	+	10
130/80	1024	56	72	67	+	14	0.18	-	-	+	10.1
130/80	1014		60	50	-	12.3	0.14	-	-	+	10
150/80	1020		71		+			+	-	+	10
120/70	1012		28	40	-	11	0.07	+	+	+	6.7
180/110	1013		23		-			+	-	+	10.5
170/90	1012	30	30	45	-	9.3	0.15	-	-	+	9.8

Nierfunct. : nierfunctie.
+ betekent normaal,
- betekent gestoord.

Röntg.-afw: afwijkingen in het Röntgenbeeld van handen, tanden, schedel, bekken en wervelkolom.
+ betekent: duidelijk afwijkingen aanwezig.
sp " : mogelijk afwijkingen aanwezig.
- " : geen afwijkingen aanwezig.

Hist. bot : histologisch onderzoek van bot van de crista iliaca.
+ betekent: afwijkingen gevonden.
- betekent: geen afwijkingen gevonden.

Op. : + betekent: abnormale bijschildklier verwijderd.
- " : geen abnormale bijschildklier gevonden.

Tabel 13

Overzicht van de gegevens van 17 contrôle personen

No	Naam	No v.d. ziekte gesch.	Leeftijd in jaren	Geslacht	Lengte in M.	Gewicht in kg.	Bloeddruk	Ureum in mg. %	P.S.P. na 1 uur	S.G. urine	Duur laatste ziekte	Diagnose
1	C.E.	Inw.G. 281/56	12	♂	1,52	31	90/70			1014	1 maand	Insuff. cordis na operatie aorta stenose
2	A.E.-S.		19	♂	1.75	67.8	140/80		59			Genezen patient 3 jaar na verwijdering bijschildklieradenoom
3	H.-E.	H.K. 26/56	23	♂	-	-	100/80	58			-	Peritonitis door perforatie
4	J.T.-B.	Inw.G. 1404/55	25	♂	1.75	57	100/50	34		1015	1 dg na op. overleden.	
5	E.M.-G.	Thor.H.K. 1744/55	30	♀	1.50	36	140/50			1026	13 dagen	Staph. coccen sepsis
6	H.-C.	Endo.P.K. 6287/55	55	♂	1.80	68	120/85		59		4 dg. na op. overleden	Open ductus Botalli
7	J.-A.	Thor.H.V. 1855/55	41	♀	1.70	59	110/70	45		1015	-	Recidiverende nierstenen
8	M.-O.	Thor.H.V. 1853/55	42	♀	-	-	135/80	25	40	1011	10 dg. na op. overleden	Mitraal stenose
9	E.-B.	Gyn. 674/55	47	♀	1.65	88	140/75				1 dg. na op. overleden	Tricuspidaal stenose
10	P.J.-V.	Neur.Chir. 643/55	45	♂	1.75	73	120/70				6 dg. na op. overleden	Uterus myomatosus
11	E.-H.	Inw.G. 1485/57	47	♂	1.65	79	-				onder op. overleden	long embolie Cervicale discus prolaps
12	G.M.-F.	Thor.H.V. 85/56	48	♀	1.62	61	115/90	35	46	1016	plotseling aan hart infarct overleden	Sinds een jaar insuff. cordis
13	A.-E.	Thor.H.V. 1466/57	52	♂	1.77	77	120/80	33	79	1024	in aansluiting aan operatie overleden	Aorta stenose
14	G.P.-B.	Inw.G. 1156/55	57	♀	1.70	49	120/80				7 dg. na op. overleden	Long t.b.c.
15	L.P.-K.	Inw.G. 1427/56	69	♂	1.75	64	105/70	36		1022	3 maand	Maag carc. met lever metastasen
16	M.-V.	Gyn. 322/56	73	♀	1.50	59	145/85	174			12 dagen	Coronair insuff. atrium fibrill
17	J.H.-Z.	H.K. 1466/57	77	♂	1.72	52	155/75	78			6 weken	Sepsis, sarcoma uteri, pyelonephritis, diab. mell.
											8 dg. na op. overleden	Volvulus v.h. sigmoid

III. *Controlepersonen*

1. Van bot van 17 controlepersonen werd een phosphaatuitwisseling en een microradiografie verricht. De klinische gegevens van deze personen werden verwerkt in tabel 13.

Daar het meeste controlemateriaal werd verkregen van overleden patienten is in deze tabel naast leeftijd, geslacht, lengte en gewicht de duur van de laatste ziekte opgegeven. Deze duur bedroeg in het algemeen minder dan twee weken. Uitzonderingen hierop vormen de nrs 1, 14 en 16. Een korte ziekteduur lijkt van belang, daar bekend is, dat immobilisatie osteoporose kan geven, ofschoon reeds geringe bewegingen van de patient het ontstaan van osteoporose voorkomen (Deitrich, c. s. 1948; Whedon c. s. 1949).

Voorzover gegevens bekend waren over de nierfunctie zijn deze in de tabel opgenomen. Aangenomen moet worden, dat patient nr 16 een gestoord nierfunctie had. De uitkomsten van microradiografie en phosphaatuitwisseling bij deze patient liggen echter dicht bij het gemiddelde.

Patiente nr 14 is wat betreft ziekteduur misschien minder geschikt als controlepersoon. Ook hier geldt echter, dat zij geen grote verschuiving van de gemiddelden heeft veroorzaakt. Tegen patient nr 2 als controlepersoon kan men op grond van het feit, dat hij 3 jaar voor de biopsie een hyperparathyreoidie had, bezwaar maken.

2. Vijf patienten met een hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie werden onderzocht. De verkregen gegevens zijn weergegeven in tabel 14.

Tabel 14

Overzicht van de klinische gegevens van vijf patienten met hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie

No	Naam	ziekte gesch.	Leeftijd	Geslacht	Diagnose	serum Calc. mg%
1.	v.H.	St. Ign. Breda	20	♂	M. Besn. Boeck.	16
2.	V.	End. Pk. 6099/54	41	♀	Vit. D intox. id. hypoparath.	14.3
3.	B.	H. K. 1883/57	51	♀	Mamma Ca. metastasen.	16.5
4.	v. P.	G. Z. d. Haag.	60	♂	Bronch. Ca. ? metastasen.	12
5.	t. B.	G. Z. d. Haag.	63	♀	Maag Ca. metastasen.	14.7

Samenvatting

De klinische gegevens werden besproken van 17 patienten met hyperparathyreoidie, van 2 van deze patienten nadat zij waren genezen van een hyperparathyreoidie, van 17 controle personen en van 5 patienten met een hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie.

Van de hyperparathyreoidiegroep werden gegevens vermeld over leeftijd, geslacht, ziekteduur, ziektebeeld, serumcalcium, -phosphaat, -alkalisch phosphatasegehalte, urinecalciumuitscheiding, bloeddruk, nierfunctie, nierphosphaatuitscheiding, röntgenbeeld van het skelet en histologie van bot van de crista iliaca.

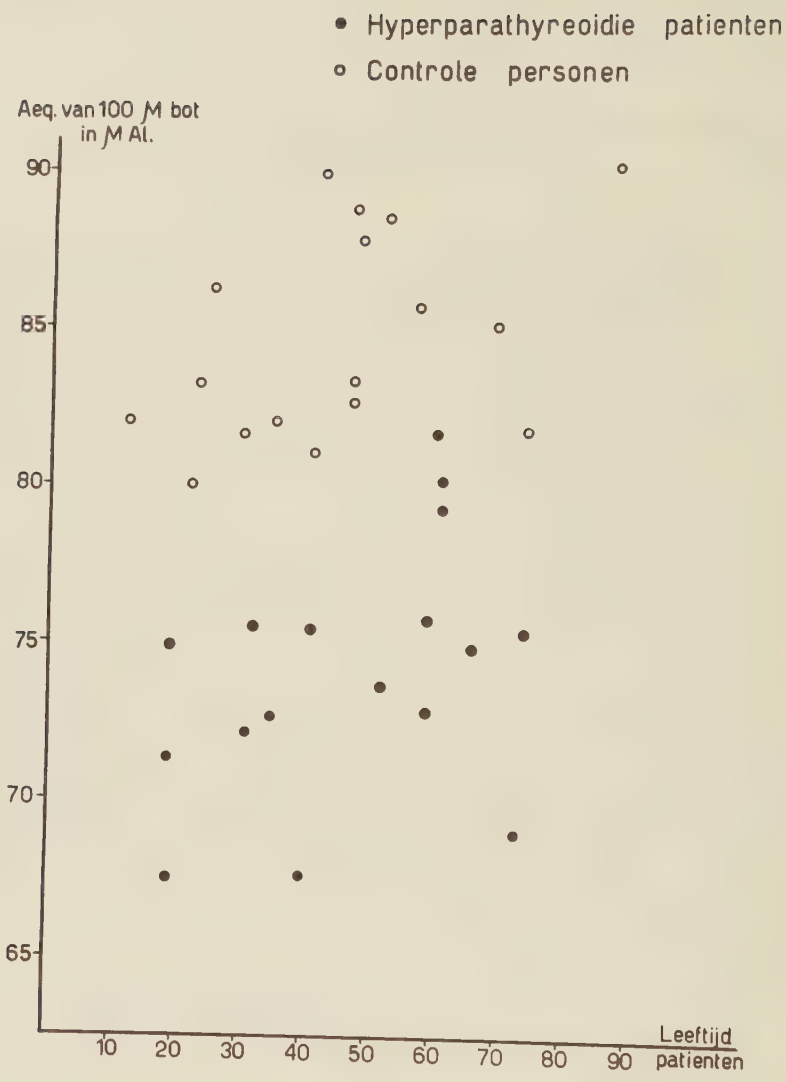
Hoofdstuk VII

TOEPASSING VAN MICRORADIOGRAFIE BIJ PATIENTEN

Botweefsel afkomstig van 17 patienten lijdende aan hyperparathyreoidie en van 17 controlepersonen werd met behulp van quantitatieve microradiografie onderzocht. Hiernaast werd het mineraalgehalte van bot van twee van de patienten met hyperparathyreoidie, ná een geslaagde behandeling gemeten. Bovendien werd bot van vijf patienten met een hypercalcaemie, die niet veroorzaakt werd door een hyperparathyreoidie, bestudeerd. De uitkomsten van de onderzoekingen bij de 17 patienten met hyperparathyreoidie en bij de 17 controlepersonen zijn weergegeven in tabel 15.

Uit de gegevens blijkt dat het gemiddelde aluminium-aequivalent van 100 micron bot bij de patienten met hyperparathyreoidie 74 μ bedraagt, met een standaard spreiding van 4, terwijl voor de controlepersonen het gemiddelde 84.6 μ was met een standaarddeviatie van 3.3. Het verschil tussen deze beide groepen is significant ($P < 0.001$). Een grafische voorstelling van de gegevens van beide groepen wordt gegeven in fig. XVI. Met behulp van de X-kwadraat proef werd bepaald, welke van de 17 patienten met hyperparathyreoidie, wanneer zij stuk voor stuk worden vergeleken met de gehele controlegroep, buiten deze groep vallen. Het blijkt, dat de uitkomsten van de patienten no 12, 13 en 14 zich niet onderscheiden van die van de controlegroep. De gegevens van de overige 14 patienten kunnen als niet tot die van de controlegroep behorend worden beschouwd.

Behalve de reeds genoemde gemiddelde waarden met de daarbij berekende standaarddeviaties werden ook gegevens verkregen over de variatie in mineraalgehalte in het bot van iedere individuele patient en controlepersoon. In ieder stukje bot werden een groot aantal metingen van het mineraalgehalte gedaan. Gemiddeld bedroeg dit aantal (n) 284 per botmonster. Uit deze metingen werd een



Figuur XVI
Vergelijking van het mineraalgehalte van het bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie en van 17 controlepersonen.

Tabel 15

Het mineraalgehalte van bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie en van 17 controlepersonen

Hyperparathyreoidie								Controle						
No	Naam	Leeft.	Gesl.	m_1	s_1	n_1	μ	Naam	Leeft.	Gesl.	m_1	s_1	n_1	μ
1	A.E.-S.	19	♂	67.3	6.5	465	49	C.-E.	12	♂	81.5	8.9	203	29
2	B.H.-K.	19	♂	71.2	13.3	168	29	A.E.-S.	22	♂	80.0	7.0	184	82
3	W.-v.G.	19	♂	74.9	8.8	142	71	H.-E.	23	♂	83.2	7.3	375	72
4	J.-H.	31	♂	72.1	8.2	217	35	J.T.-B.	25	♂	86.2	6.1	329	50
5	H.-d.L.	31	♂	75.5	5.3	156	94	E.M.-G.	30	♀	81.6	7.1	303	68
6	P.J.J.-K.	35	♂	72.6	12.6	642	80	H.-C.	35	♂	82.0	9.5	187	84
7	E.A.-P.	40	♀	67.5	11.0	297	90	J.-A.	41	♀	81.0	7.2	279	29
8	L.-J.	41	♀	75.4	10.4	472	39	M.-O.	42	♀	89.8	8.5	217	41
9	F.J.-v.V.	52	♀	73.6	6.7	297	69	E.-B.	47	♀	83.3	9.0	186	38.5
10	A.-H.	59	♀	72.8	12.1	194	70	P.J.-K.	47	♂	82.6	7.4	332	48
11	E.J.-v.E.	59	♀	74.7	7.5	147	70	E.-H.	47	♂	88.7	4.2	251	90
12	A.-H.	60	♀	81.6	3.7	97	94	G.M.-F.	48	♀	87.7	8.2	859	30
13	L.-v.G.	61	♂	79.6	13.7	224	73	A.-E.	52	♂	88.4	4.1	117	86
14	G.-v.L.	61	♂	80.1	7.6	223	73	G.P.-B.	57	♀	85.6	9.0	407	32
15	L.H.-H.	66	♀	74.8	10.5	562	30	L.P.-K.	69	♂	85.0	7.7	310	30
16	A.H.-d.W.	73	♂	68.9	9.2	245	67	M.-V.	74	♀	81.7	8.0	274	86
17	E.-v.d.J.	74	♀	75.3	10.1	200	91	J.H.-Z.	87	♂	90.0	4.1	91	87
	s_2			4				s_2			3.3			
	m_2	47		74	9.2	279	66	m_2	45		84.6	7.6	288	58

m_1 = gemiddeld al. aeq. van 100 μ bot bij ieder individu afzonderlijk in micra.
n_1 = aantal photometrische aflezingen.
s_1 = standaardspreiding van het al. aeq. van 100 μ bot bij ieder individu afzonderlijk.
m_2 = gemiddelde van de groep.
s_2 = standaardspreiding van de groep.
μ = dikte van het botslijppraeparaat in micra.

gemiddelde berekend en dit gemiddelde is in tabel 15 onder m_1, in de vierde kolom weergegeven. De standaardspreiding van de meetuiktomsten staat in de vijfde kolom onder s_1. De gemiddelde standaardspreiding bij 17 patienten met hyperparathyreoidie was 9.2, terwijl deze bij 17 controlepersonen 7.6 bedroeg. De kans dat het verschil tussen de gemiddelde standaardspreiding van beide groepen door het toeval zou zijn veroorzaakt, bedraagt ongeveer 5%.

In figuur XVII zijn alle metingen, verricht in bot van patienten met hyperparathyreoidie en alle metingen verricht in bot van de controlepersonen, in groepen ter grootte van 5 μ aluminium aequivalent ingedeeld. De frequentieverdeling van de groepen is grafisch weergegeven. De curve die betrekking heeft op gegevens van

patienten met hyperparathyreoidie is breder en ligt verschoven naar links t.o.v. de curve van de controlepersonen.

Uit de in tabel 15 gegeven getallen blijkt, dat het gemiddelde mineraalgehalte van het bot van de hyperparathyreoidiegroep ongeveer 11% lager ligt dan dat van de controlegroep. Hieruit volgt zeer waarschijnlijk, dat het bot bij de hyperparathyreoidiegroep gemiddeld jonger is dan bij de controlegroep (zie hoofdstuk I en de inleiding van hoofdstuk IV).

Ook de grotere standaardspreiding van de verschillende kalkgehalten bij ieder afzonderlijk individu van de hyperparathyreoidiegroep t.o.v. de controlegroep pleit voor een grotere vernieuwingssnelheid van het bot in de hyperparathyreoidiegroep. De invloed van de leeftijd van de onderzochte personen komt in dit beperkte materiaal niet naar voren.

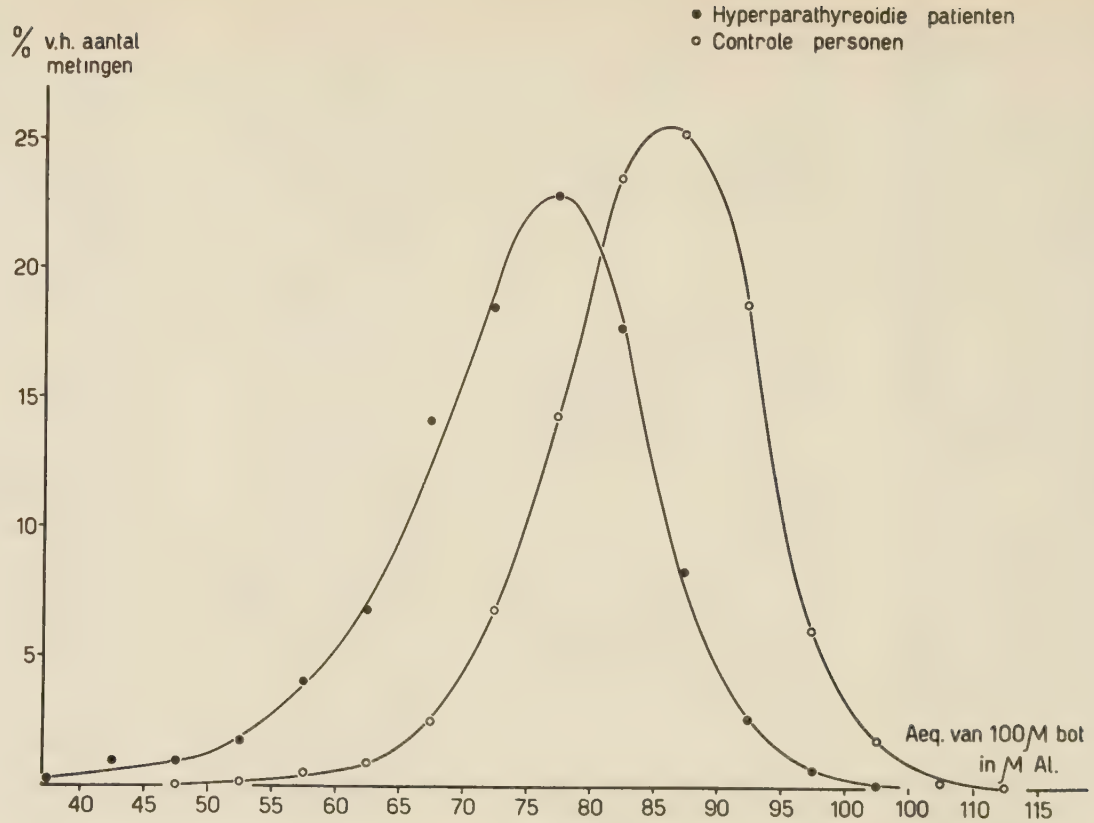
Van 2 patienten (nr 1 en 15 van tabel 15) werd het mineraalgehalte van het bot gemeten, nadat de patienten, wat de hyperparathyreoidie betreft, genezen waren. De gegevens van het onderzoek vóór en na de behandeling worden gegeven in tabel 16.

Tabel 16

Uitkomsten van de mineraalbepaling in bot bij twee patienten (nr 1 en 15 van tabel 15) met hyperparathyreoidie vóór en na verwijdering van een bijschildklieradenoom.

No	Naam	aeq. van 100 μ bot in μ aluminium		
		vóór operatie	na operatie	
1	A.E.-S.	67.3	80	tweede botpiopsie 3 jaar na de operatie, patient gezond.
15	L.H.-H.	74.8	78.2	tweede botbiopsie 1 jaar na de operatie, patient uraemisch overleden.

Bij de eerste patient werd drie jaar na de operatie in het bot een hoger mineraalgehalte gevonden dan vóór de operatie. Bij de tweede patient werd één jaar na de operatie wel een hoger getal voor het mineraalgehalte gevonden; het verschil met de uitkomst van de eerste bepaling kan echter gemakkelijk door het toeval zijn veroorzaakt.



Figuur XVII

Frequentieverdeling van 4740 metingen in bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie en van 4900 metingen in bot van 17 controlepersonen, gerangschikt naar het al. aequivalent van 100 micron bot van iedere meting.
Van de hyperparathyreoidiegroep bedraagt het gemiddelde 74 μ met een standaardspreiding van 9.2 μ.
Van de controlegroep bedraagt het gemiddelde 84.6 μ met een standaardspreiding van 7.6 μ.

Van 5 patienten met een hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie, werd het mineraalgehalte van het bot gemeten. De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 17.

Tabel 17

Het mineraalgehalte van het bot van 5 patienten met hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie

Nr	Naam	ziekte gesch.	Leeftijd in jaren	Diagnose	Aeq. 100 bot in alumin.	
1.	v.H.	St. Ign. Breda	20	M. Besn. Boeck.	79.5	
2.	V.[1]	End. Pk. 6099/54	41	Vit. D intox. id. hypoparath.	74.3	
3.	B.	H. K. 1883/57	51	Mamma Ca. metastasen	84.7	gemiddeld: 82
4.	v.P.	G. Z. d. Haag	60	Bronch. Ca? metastasen	88.5	
5.	t.B.	G. Z. d. Haag	63	Maag Ca. metastasen	83.5	

Alleen de patient met een hypoparathyreoidie en een Vitamine D-intoxicatie had een laag mineraalgehalte van het bot. De patient met een M. Besnier Boeck en de drie patienten met carcinoommetastasen hadden een normaal mineraalgehalte van het bot. Gemiddeld werd in het bot van deze 5 patienten voor 100 μ bot een aluminium aeq. van 82 μ berekend.

Samenvatting

1. Zeventien patienten met hyperparathyreoidie bleken gemiddeld een lager mineraalgehalte te hebben (100 μ bot ≙ 74 ± 4 μ aluminium) dan 17 controlepersonen (100 μ bot ≙ 84.6 ± 3.3 μ aluminium).

2. De variatie in kalkgehalte in het bot van patienten met hyperparathyreoidie is waarschijnlijk groter dan in dat van controlepersonen.

5. Het bot van twee patienten met hyperparathyreoidie werd respectievelijk 3 jaar en 1 jaar na de verwijdering

van een bijschildklieradenoom onderzocht. Bij de eerste patient werd na de operatie een hoger mineraalgehalte van het bot gevonden vergeleken met dat van vóór de operatie. Bij de tweede patient kon een stijging van het mineraalgehalte na de operatie niet worden aangetoond.

4. Vijf patienten met een hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie hadden gemiddeld een normaal mineraalgehalte van het bot (100 μ bot ∽ 82 μ aluminium).

Hoofdstuk VIII

TOEPASSING VAN PHOSPHAAT-UITWISSELINGSPROEVEN IN VITRO MET BOTWEEFSEL VAN PATIENTEN

De uitkomsten van het onderzoek met behulp van de phosphaatuitwisselingsproef in vitro van bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie en van 17 controlepersonen worden vermeld in tabel 18. De resultaten van het microradiografisch onderzoek werden reeds in hoofdstuk VII vermeld. Klinische gegevens van de betreffende patienten zijn weergegeven in hoofdstuk VI.

Zoals in tabel 18 is vermeld, bedroeg het gemiddelde uitwisselingspercentage van het bot van patienten met hyperparathyreoidie 123.2 $\pm$ 13.2%, terwijl dit van de controlegroep slechts 99 $\pm$ 6.9% bedroeg. Uit een statistische berekening volgt, dat de kans, dat dit verschil door het toeval zou zijn veroorzaakt kleiner dan één op duizend is.

Met behulp van de X-kwadraat proef werd bepaald welke van de uitkomsten bij de patienten met hyperparathyreoidie wanneer zij stuk voor stuk worden vergeleken met de controle groep van 17, buiten deze groep vallen. Bij de berekeningen werd geen rekening gehouden met de leeftijd van de individuen.

Het blijkt dat de uitkomsten van de phosphaatuitwisselingsproef in het bot van de patienten 10, 12 en 14 zich niet onderscheiden van de uitkomsten bij de controle personen, terwijl de uitkomst van patient no 13 een grens waarde is.

De gegevens van de overige 13 patienten kunnen als niet tot de controle groep behorend worden beschouwd.

Door het phosphaatgehalte van de vloeistof, geïncubeerd met bot van patienten met hyperparathyreoidie, te vergelijken met het phosphaatgehalte van de vloeistof, geïncubeerd met standaardbot, werd een lager phosphaatgehalte van de vloeistof, dus een hogere opneming in het bot bij de proef met het bot van patienten met hyperparathyreoidie vastgesteld. Deze verhoging bedroeg gemiddeld 36 γ (n = 17 tabel 18a).

Tabel 18

De phosphaatuitwisseling van bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie en van 17 controlepersonen

Hyperparathyreoidie								Controle						
				Phosph. uitw. in %							Phosph. uitw. in %			
Nr	Naam	Leeftijd in jaren	Geslacht	Abs.	Gem.	Rel.	mg bot	Naam	Leeftijd in jaren	Geslacht	Abs.	Gem.	Rel.	mg bot
1	A. E. -S.	19	♂	44,6	44,6	140,3	1,3	C. -E.	12	♂	31,3	32,0	108,8	10,0
2	B. H. -K.	19	♂	40,4	39,2	134,0	10,0	A. E. -S.	22	♂	32,6	29,7	106,0	10,0
3	W. -v. G.	19	♂	38,1	41,2	141,0	3,4	H. -E.	23	♂	28,6	30,7	108,0	10,0
4	J. -H.	21	♂	42,4	34,7	118,0	10,0	J. T. -B.	25	♂	31,3	30,3	108,0	10,0
5	H. -d. L.	21	♂	34,3	31,8	117,0	2,1	E. M. -G.	30	♀	25,6	28,1	102,0	10,0
6	P. J. J. -K.	35	♂	31,8	37,3	123,0	7,2	H. -C.	35	♂	27,7	27,9	98,0	10,0
7	E. A. -P.	40	♀	37,5	38,6	129,0	3,0	J. -A.	41	♀	28,1	28,0	106,0	2,8
8	L. -J.	41	♀	36,9	38,2	126,0	10,0	M. -O.	42	♀	26,0	26,2	96,0	10,0
9	F. J. -v. V.	52	♀	39,5	37,3	127,0	8,2	E. -B.	47	♀	26,5	30,1	98,5	10,0
10	A. -H.	59	♀	37,0	33,1	111,0	2,0	P. J. -K.	47	♂	30,2	25,1	92,0	10,0
11	E. J. -v. E.	59	♀	37,6	33,7	118,0	3,4	E. -H.	47	♂	21,0	30,9	108,0	10,0
12	A. -H.	60	♀	33,1	29,3	99,0	2,8	G. M. -F.	48	♀	29,8	27,2	90,0	10,0
13	L. -v. G.	61	♂	33,2	32,9	115,0	5,0	A. -E.	52	♂	26,1	29,5	100,5	10,0
14	G. -v. L.	61	♂	32,9	26,7	95,0	3,6	G. P. -B.	57	♀	29,6	29,3	98,0	10,0
15	L. H. -H.	66	♀	29,6	41,2	136,0	10,0	L. P. -K.	69	♂	29,5	26,8	96,0	10,0
16	A. H. -d. W.	73	♂	37,9	38,8	134,0	4,9	M. -V.	74	♀	29,5	25,6	86,0	10,0
17	E. -v. d. J.	74	♀	40,8	38,4	131,0	4,5	H. H. -Z.	87	♂	29,7	30,5	102,0	10,0
				38,3							31,5	29,7	102,0	10,0
											31,8	31,1	102,0	10,0
											27,2	26,4	84,0	10,0
											25,1			
	s					13,2							6,	
	m	47				123,2	5,4	m	45				98,0	8,6

m = gemiddelde van de groep.
s = standaardspreiding van de groep.
abs. = gemeten phosphaatuitwisseling.
gem. = gemiddelde van abs.
Rel. = phosph. uitwisseling, uitgedrukt in % van de standaard.
mg bot = droog gewicht van de hoeveelheid bot die werd gebruikt.

Eenzelfde vergelijking, gemaakt tussen het phosphaatgehalte van de vloeistof bij proeven met bot van controlepersonen en met standaardbot, leerde dat hier gemiddeld de verhoging 7 bedroeg. (n = 17).

Tabel 18a

Verschuiving van phosphaat van vloeistof naar bot in de phosphaatuitwisselings proef bij 17 patienten met hyperparathyreoidie en bij 17 controle personen

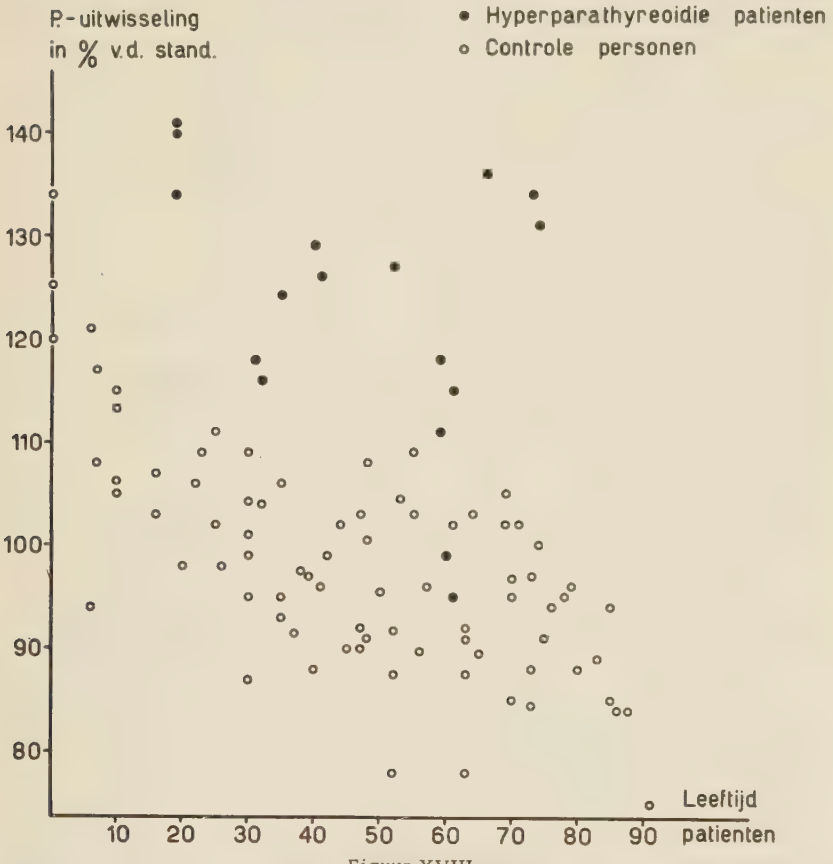
Hyperparathyreoidie		Controle	
No patient	Verschil in microgrammen	No persoon	Verschil in microgrammen
1	- 39	1	- 15
2	- 15	2	+ 5
3	- 59	3	- 35
4	- 5	4	- 20
5	- 28	5	- 21
6	- 55	6	- 11
7	- 33	7	+ 7
8	- 5	8	+ 14
9	- 71	9	0
10	- 75	10	- 14
11	- 29	11	- 20
12	- 21	12	- 22
13	- 40	13	+ 10
14	- 26	14	+ 13
15	0	15	- 27
16	- 61	16	+ 15
17	- 51	17	+ 15
gem.	- 36		- 7

Verschil in microgrammen: Het phosphaat van de vloeistof geïncubeerd met bot van de proefpersoon, verminderd met het phosphaat gehalte van de vloeistof geïncubeerd met standaard bot. In die proeven waarbij minder dan 10 mg botpoeder werd gebruikt werd het verschil omgerekend op standaard voorwaarden.
No patient en No persoon: zie tabel 18.

Hieruit volgt, dat het bot van patienten met hyperparathyreoidie per 10 mg botpoeder gemiddeld 29 microgram phosphor meer opneemt dan het bot van controlepersonen. Wanneer wij aannemen, dat 10 mg botpoeder ongeveer 900 microgram phosphor bevat en wij de opneming van phosphaat berekenen als uitwisseling, geeft dit een verhoging van het uitwisselingspercentage van ca 11%. Gemiddeld bleek het uitwisselingspercentage van het bot van patienten met hyperparathyreoidie (123.2%) 24% hoger te liggen dan dat van de controlegroep (99%).

Van deze verhoging komt dus ongeveer 45% voor rekening van een toeneming van de phosphaatopneming in het bot en ongeveer 55% voor rekening van een toeneming van de uitwisseling.

Hiernaast werd de phosphaatuitwisseling van het bot van patienten met hyperparathyreoidie vergeleken met een tweede controlegroep (fig. XIX). Deze controlegroep werd voor een groot deel verkregen door onderzoek van ongeselecteerd obductiemateriaal. Patienten met skelet-



Figuur XVIII

Vergelijking van het phosphaatuitwisselingspercentage van bot van patienten met hyperparathyreoidie met dat van bot van controlepersonen. In de controlegroep, grotendeels verkregen door onderzoek van obductiemateriaal, valt de leeftijdsinvloed op. In de hyperparathyreoidiegroep, die een gemiddeld hoger uitwisselingspercentage heeft dan de controlegroep, is deze invloed minder duidelijk.

afwijkingen of met nierafwijkingen werden niet in de groep opgenomen. De resultaten van een statistische bewerking van dit materiaal, voorzover het bot van individuen ouder dan 18 jaar betreft, wordt gegeven in tabel 19. Het verschil tussen deze controlegroep met een gemiddelde van 93.6% en de hyperparathyreoidiegroep met een gemiddelde van 123.2% is significant ($P < 0.001$).

Tabel 19

Vergelijking tussen de phosphaatuitwisseling van het bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie en van 62 controlepersonen

	m	n	s	gem. leeft.
Controlepersonen	93.6	62	8.2	56
Pat. met hyperparath.	123.2	17	13.2	47

m = gemiddelde
n = aantal
s = standaardspreiding

Op de invloed van de leeftijd van de individuen zal nog nader worden ingegaan.

Van twee patienten met hyperparathyreoidie (nr 1 en 15 van tabel 18) werd bot verkregen, nadat met succes operatief was ingegrepen (zie tabel 20).

Tabel 20

Phosphaatuitwisseling van bot van twee patienten met hyperparathyreoidie vóór en na behandeling

No	Naam	Bijzonderheden	phosphaatuitwisseling in procenten vóór de operatie		na de operatie	
			abs.	rel.	abs.	rel.
1	A.E.-S.	2e biopsie 3 j. na operatie patient gezond	44.6	140.3	29.7	106
15	L.H.-H.	2e biopsie 1 j. na operatie, pat. uraemisch overleden	39.6	136	23.8	87

Patient nr 1 was op het ogenblik van de tweede biopsie, 3 jaar na de operatie, geheel gezond. Patient nr 15 overleed, 1 jaar na de operatie, aan een nierinsufficiëntie. De biopsie werd post mortem verricht. Bij beide patienten werd bij het tweede onderzoek een sterke daling van

de phosphaatuitwisseling gevonden in vergelijking met het eerste onderzoek.

Hiernaast werd het phosphaatuitwisselingspercentage bepaald van bot van vijf patienten met een hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie. De uitkomsten van dit onderzoek zijn vermeld in tabel 21.

Tabel 21

Phosphaatuitwisseling van bot van 5 patienten met hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie

No	Naam	Ziekte gesch. no.	Leeftijd in jaren	Diagnose	Phosph. uitw. in %		
					abs.	rel.	
1	v.H.	St. Ign. Breda	20	M. Besn. Boeck	29.9	118	
2	V.	End. Pk. 6099/54	41	Vit. D intox. id. hypoparath.	20.5	70	gemiddeld: 96
3	B.	H.K. 1883/57	51	Mamma Ca. metastasen	27.6	93	
4	v.P.	G.Z. d.Haag	60	Bronch. Ca? metastasen	29.3	107	
5	t.B.	G.Z. d.Haag	63	Maag Ca. metastasen	25.3	94	

Het uitwisselingspercentage van deze groep was gemiddeld normaal (96%). Patient no 1 met een Besnier Boeck vertoont een enigszins hoog uitwisselingspercentage. De uitkomst valt echter nog onder de bovengrens van het normale (vergelijk figuur XVIII).

Tenslotte werd de invloed van de leeftijd van het individu, waarvan het bot werd verkregen, nagegaan. Uit fig. XVIII blijkt, dat de phosphaatuitwisseling van het bot een negatieve correlatie vertoont met de leeftijd van de persoon. Vooral wanneer wij groeiende individuen vergelijken met volwassenen valt de leeftijdsinvloed op.

De negatieve correlatie met de leeftijd werd ook in het dierexperiment aangetoond.

Van een groep van vijftig manlijke ratten (Groot Wistarstam) van ongeveer gelijke geboortedatum werden aanvankelijk om de zes weken, later met grotere tijdsintervallen, vijf dieren gedood. De eerste proef werd gedaan met ratten van 6 weken oud. De femora van de dieren werden vrij gepraepareerd en in drie delen verdeeld. Van ieder proefdier werd van het proximale en

Figuur XIX
Het verband tussen leeftijd van het proefdier en phosphaatuitwisseling van het bot bij ratten.
Elk punt van de curve stelt een gemiddelde van 5 proefdieren voor.
A. Epiphyse: distale en proximale vijfde deel van de femora.
B. Diaphyse: middelste drie vijfde deel van de femora.

distale vijfde gedeelte van het femur gezamenlijk, evenals van het centrale drievijfde gedeelte, botpoeder gemaakt. Dit botpoeder werd met behulp van de phosphaatuitwisselingsproef onderzocht. Van de vijf botmonsters, die bij iedere bepaling werden onderzocht, werd een ge-

middelde berekend. In figuur XIX zijn de uitkomsten van deze berekeningen grafisch uitgezet tegen de leeftijd van de betreffende proefdieren. Uit de figuur blijkt, dat een negatieve correlatie bestaat tussen de phosphaatuitwisseling van het bot en de leeftijd van de proefdieren.

Samenvatting

1. Het bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie bleek gemiddeld een hoger phosphaatuitwisselingspercentage te hebben dan dat van 17 controlepersonen; de uitwisselingspercentages bedroegen respectievelijk 123.2 ± 13.2% en 99 ± 6.9%.

2. De hogere phosphaatuitwisseling van het bot van patienten met hyperparathyreoidie t.o.v. de controlegroep bleek voor een deel te zijn veroorzaakt door een stijging van de opneming van phosphaat uit de vloeistof in het bot.

3. Ook bij vergelijking met een controlegroep van 62 personen werd een overeenkomstig verschil gevonden. Bij deze controlegroep werd een gemiddelde van 93.6 ± 8.2% berekend.

4. Van twee patienten van de hyperparathyreoidiegroep werd na genezing van de bijschildklierziekte bot verkregen. Het phosphaatuitwisselingspercentage was bij het tweede onderzoek lager dan bij het eerste onderzoek.

5. Vijf patienten met een hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie, hadden gemiddeld een normaal uitwisselingspercentage.

6. Uit bestudering van de uitkomsten van het onderzoek bij de groep van 62 controlepersonen blijkt een negatieve correlatie te bestaan tussen phosphaatuitwisseling van het bot en de leeftijd van het individu.

7. De negatieve correlatie tussen phosphaatuitwisseling van bot en de leeftijd van het individu werd eveneens in een proef met ratten aangetoond.

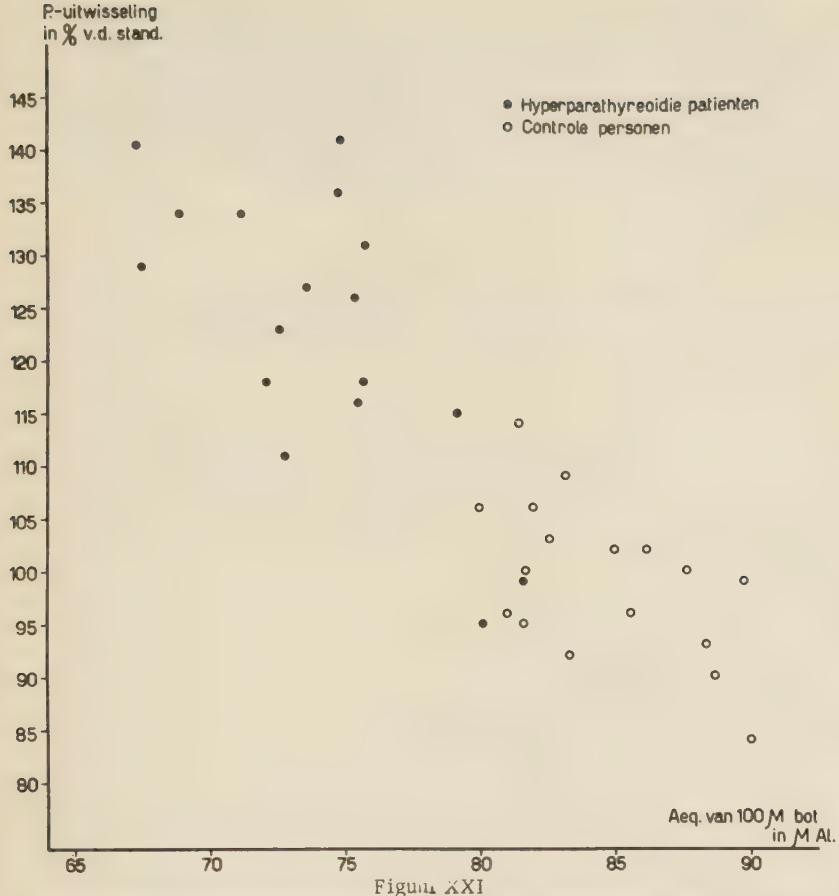
Hoofdstuk IX

BESPREKING VAN HET VERBAND TUSSEN DE GEGEVENS DIE MET DE VERSCHILLENDE METHODEN VAN ONDERZOEK WERDEN VERKREGEN

In de voorafgaande hoofdstukken werden de uitkomsten vermeld van de klinische onderzoekingen en van het onderzoek van bot met behulp van microradiografie en van een phosphaatuitwisselingsproef in vitro van 17 patienten met hyperparathyreoidie en van 17 controle personen. Daar zeer waarschijnlijk zowel de microradiografie als de phosphaatuitwisselingsproef in vitro met bot, gegevens verschaffen over de vernieuwing van bot (zie hoofdstuk I) lijkt het van belang de onderlinge samenhang tussen deze twee grootheden na te gaan. Door beide grootheden grafisch tegen elkaar uit te zetten (zie fig. XXI) wordt het verband duidelijk. Uit een berekening volgt, dat de correlatie coefficient voor de hyperparathyreoidie groep -0.69 bedraagt en voor de hyperparathyreoidie groep met de controle groep samen -0.62. De kans dat deze correlaties door het toeval zouden zijn veroorzaakt is kleiner dan één op duizend. In het algemeen kan worden gezegd, dat bot met een laag mineraal gehalte een hoge phoshaatuitwisseling in vitro heeft en omgekeerd.

Vier patienten met hyperparathyreoidie, bij wie met behulp van röntgenonderzoek afwijkingen van het skelet werden gevonden (nrs 1, 9, 15 en 16 van tabel 12), onderscheiden zich, wat de uitkomsten van microradiografie en phosphaatuitwisseling betreft, niet van de overige patienten met hyperparathyreoidie. Ditzelfde kan worden gezegd van de twee patienten bij wie histologisch afwijkingen in het bot werden aangetoond. (Nr 6 en 15, tabel 12).

Merkwaardig is, dat het bot van de crista iliaca van patient nr 14 (tabel 12) een normaal mineraalgehalte (100 µ bot is aequivalent met 80.1 µ aluminium) en een normale phosphaatuitwisseling (95%) heeft, terwijl bij deze patient met het routine röntgenonderzoek afwijkingen



Figuur XXI

Grafische voorstelling van de samenhang tussen het mineraal gehalte en de phosphaatuitwisseling in vitro van het bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie en van 17 controle personen.
Merkwaardig is dat de patient met een Al. aeq. van 100 µ bot van 80.1 µ en een phosphaat uitwisseling van 95% het beeld van de ostitis fibrosa generalisata cystica vertoonde.

in een wervel en in de schedel werden gevonden. Bij histologisch onderzoek van materiaal uit de schedel werd een ostitis fibrosa cystica vastgesteld. Bij deze patient konden dus in het bot van de crista iliaca geen afwijkingen worden aangetoond, terwijl elders in het skelet locale afwijkingen aanwezig waren.

Om vast te stellen of er binnen de hyperparathyreoidie groep een wiskundig verband bestaat tussen de gegevens verkregen door microradiografie en phosphaatuitwisseling in vitro enerzijds en door het overige onderzoek an-

derzijds werden de verschillende gegevens van het klinisch onderzoek grafisch uitgezet tegen de uitkomsten van microradiografie en phosphaatuitwisselingsproef. De correlatie coefficient van twee reeksen gegevens werd alleen dan uitgerekend, wanneer de grafische voorstelling een verband deed vermoeden. In tabel 20 zijn de combinatiemogelijkheden weergegeven.

Tabel 20

Het wiskundig verband tussen de verschillende onderzoekingen bij 17 patienten met hyperparathyreoidie

	phosph. uitw.	serum calc.	serum phosph.	serum alk. phosphatase	urine ca.	phosphaat index	Hist. bot (onderzoek)	Röntg. (onderzoek)
microradiografie	+a	+b	-	-	-	-	-	-
phosphaatuitw.		+c	-	-	-	-	-	-

+ : correlatie aanwezig.
- : correlatie afwezig.
a: correlatie coefficient: -0.69 P < 0.001
b : " " : -0.56 P = 0.02
c : " " : +0.56 P = 0.02

Behalve de correlatie tussen microradiografie en phosphaatuitwisseling van bot werd dus een wiskundig verband vastgesteld tussen de uitkomsten van het serumcalciumgehalte en het mineraalgehalte van het bot. De correlatie coefficient bedroeg -0.56 (P = 0.02). Bovendien werd een verband vastgesteld tussen serumcalcium gehalte en phosphaatuitwisseling in vitro van bot. Hier bedroeg de correlatie coefficient 0.56 (P = 0.02).

Samenvatting

Uit een wiskundige bewerking van de uitkomsten van de verschillende proeven bij patienten met hyperparathyreoidie volgt, dat er een correlatie bestaat:

1. tussen de uitkomsten van het onderzoek met behulp van microradiografie en de uitkomsten van de phosphaatuitwisselingsproef (R = -0.69, P < 0.001);

2. tussen het serumcalciumgehalte van de patient en het mineraalgehalte van het bot ($R = -0.56$, $P = 0.02$);

3. tussen het calciumgehalte van het serum van de patient en de uitkomst van de phosphaatuitwisselingsproef met bot in vitro ($R = 0.56$ $P = 0.02$).

Hoofdstuk X

NABESCHOUWING

De ostitis fibrosa generalisata cystica werd in 1891 door von Recklinghausen beschreven. Eerst dertig jaar later werd het verband van deze botziekte met de bijschildklieren bewezen. In de hierop volgende decennia werd de aandacht gevestigd op de biochemische afwijkingen. Het bleek dat nierafwijkingen veelvuldig voorkomen. Het merkwaardige feit deed zich voor, dat slechts bij een derde deel van de patienten botafwijkingen werden gevonden, ofschoon bewezen was, dat het parathormon een directe werking op het bot heeft.

Uit het onderzoek, dat in de vorige hoofdstukken werd beschreven, volgt, dat bij 15 van 17 patienten met hyperparathyreoidie afwijkingen konden worden aangetoond in ogenschijnlijk gezond bot van de crista iliaca. Bij 2 van de 17 patienten werden deze afwijkingen niet gevonden, bij één van deze 2 patienten werden echter locale botafwijkingen elders in het skelet vastgesteld. Uiteindelijk bleken dus 16 van de 17 patienten skeletafwijkingen te vertonen.

Met dit nieuw verkregen gegeven komen wij dus weer terug tot de oude zienswijze dat de hyperparathyreoidie inderdaad een skeletziekte is. Het meest aannemelijk lijkt de opvatting dat de hyperparathyreoidie een ziekte is die het gehele organisme aantast (evenals dit het geval is bij andere ziekten met ontregelingen van hormonproductie), waarbij het bot en de nier de organen zijn waarvan het gemakkelijkst afwijkingen worden aangetoond.

Het probleem van de locale botafwijkingen wordt door het onderzoek niet opgelost, integendeel, onderstreept. Bij één patient immers werden belangrijke locale botafwijkingen aangetoond, terwijl in het bot van de crista iliaca noch met behulp van microradiografie, noch met behulp van de phosphaatuitwisselingsproef, noch histologisch, afwijkingen werden gevonden.

De botafwijkingen, die in het onderzoek werden ge-

vonden, zijn vermoedelijk niet van qualitatieve, doch van quantitatieve aard. Waarschijnlijk wordt alleen een versnelling van de physiologische vernieuwing van het bot aangetoond. De proeven zijn dan ook geenszins typisch voor de ziekte hyperparathyreoidie. Het is te verwachten dat ook andere botafwijkingen met een verhoogde aanmaak van jong bot een laag gemiddeld mineraalgehalte en een hoge phosphaatuitwisseling zullen hebben. In enkele gevallen, niet beschreven in dit onderzoek, werd dit ook gevonden, bijvoorbeeld bij de ziekte van Paget.

Uit de waarnemingen, gedaan bij de verkalking van botcallus bij het konijn (Holmstrand, 1957) en van de verkalking van menselijk foetaal bot (Wallgren, 1957), blijkt, dat nieuw aangelegd bot in de loop van enige weken 80% van de maximale mineralisatie bereikt. Hierna neemt het mineraalgehalte zeer langzaam toe, totdat na 1 tot 2 jaar een maximale verkalking is bereikt. Wanneer wij deze waarnemingen over mogen brengen op de mens en met name op patienten met hyperparathyreoidie (zie inleiding van hoofdstuk IV) en wanneer wij de opvatting accepteren, dat bot in toto wordt afgebroken, moeten wij de vondst van het verlaagde mineraalgehalte bij patienten met hyperparathyreoidie verklaren door een versterkte botaanmaak. Dat deze versterkte botaanmaak niet weerspiegeld wordt in het histologisch beeld van het bot en in het alkalische phosphatasegehalte van het bloed, kan uit de aard van de gebruikte onderzoekmethoden worden begrepen.

Indien het geoorloofd is de curve van Holmstrand over het verband tussen het mineraalgehalte van callus bij het konijn en de ouderdom van de callus te gebruiken om de gemiddelde leeftijd van het bot van de hyperparathyreoidiegroep en van de controlegroep te bepalen, zouden deze resp. 4 maanden en 2 jaar bedragen. Ofschoon deze bepalingen geen enkele absolute waarde hebben, lijkt het niet uitgesloten, dat op deze wijze toch een benaderingswaarde wordt gevonden.

De correlatie tussen de uitkomsten van het botmineraalgehalte en de uitkomsten van de phosphaatuitwisselingsproef in vitro met bot, is duidelijk. Dit kan worden opgevat als een steun voor de hypothese over een versnelde botaanmaak bij de hyperparathyreoidie.
Merkwaardig is dat, wat de klinische gegevens betreft, alleen een zekere correlatie tussen het serumcalciumgehalte en het botmineraalgehalte en tussen het serum-

calciumgehalte van de phosphaatuitwisseling van bot werd gevonden. Een verband tussen het alkalische phosphatasegehalte van het serum en de afwijkingen in het bot kon tot onze verwondering in dit onderzoek niet aannemelijk worden gemaakt.

Wat de phosphaatuitwisselingsproef betreft, dient te worden opgemerkt, dat het woord uitwisseling niet geheel terecht werd gebruikt, omdat de opneming van phosphaat door het bot groter was dan de afgifte. In het algemeen wordt van uitwisseling gesproken, wanneer de opneming gelijk is aan de afgifte. Het is echter waarschijnlijk, dat de opneming en afgifte van ionen van het botkristal niet essentieel anders verloopt, wanneer beide processen gelijk in grootte zijn dan wanneer het ene proces het andere overtreft. (Neuman 1958).

Samenvatting

In een nabeschouwing wordt er op gewezen, dat bij 16 van 17 patienten met hyperparathyreoidie afwijkingen van het skelet werden gevonden.

De bewering dat het skelet slechts bij een derde deel van de patienten met hyperparathyreoidie afwijkingen vertoont wordt hierdoor weerlegd.

Het gemiddelde mineraalgehalte van het bot van 17 patienten met hyperparathyreoidie komt vermoedelijk overeen met dan van botcallus van 4 maanden oud van het konijn. Het gemiddelde mineraalgehalte van het bot van 17 controlepersonen komt vermoedelijk overeen met dat van botcallus van 2 jaar oud van het konijn.

SAMENVATTING

De samenhang van de, in 1891 door von Recklinghausen beschreven ostitis fibrosa generalisata cystica, met afwijkingen van de bijschildklieren werd eerst in de twintiger jaren duidelijk. Uit deze historische ontwikkeling is het begrijpelijk dat de hyperparathyreoidie aanvankelijk als een skeletziekte werd beschouwd. Langzamerhand werd het echter duidelijk dat de ziekte geheel andere syndromen veroorzaken. Met name treedt vaak een beeld op waarbij nierafwijkingen op de voorgrond staan. Een enkele keer wordt het klinisch beeld beheerst door verschijnselen die terug te voeren zijn op een hypercalcaemie.

Het merkwaardige feit doet zich voor dat een ziekte, veroorzaakt door een overmatige productie van een hormon, waarvan is vastgesteld dat het een directe werking op de stofwisselingsprocessen van het bot heeft, gewoonlijk zonder aantoonbare skeletafwijkingen verloopt.

Wanneer wordt aangenomen dat de versterkte botafbraak, veroorzaakt door een overmaat parathormon, wordt gecompenseerd door een versterkte botaanmaak, zou het ontbreken van röntgenologisch aantoonbare afwijkingen in het skelet kunnen worden verklaard.

Het doel van het onderzoek was gegevens te verzamelen die een inzicht zouden kunnen geven in de verhouding van aanmaak- en afbraakprocessen van het bot bij patienten met hyperparathyreoidie. Daartoe werd gebruik gemaakt van quantitatieve microradiografie en van phosphaatuitwisselingsproeven in vitro met botmonsters verkregen door biopsie bij patienten (Hoofdstuk I).

In hoofdstuk II wordt een overzicht gegeven over hetgeen bekend is over de microstructuur van beenweefsel. Tevens wordt er de nadruk op gelegd dat het skelet een belangrijke functie heeft als voorraadorgaan van gemakkelijk te mobiliseren mineralen. De uitwisselingsreacties van ionen van de mineralen uit het bot tegen die van de omringende vloeistof worden besproken.

De techniek voor het verrichten van de biopsie uit de crista iliaca wordt beschreven in hoofdstuk III. Gebruik

wordt gemaakt van de holle botboor van Sacker en Nordin. De aandacht wordt er op gevestigd dat literatuurgegevens de verwachting wettigen dat spongieus bot, waaruit een monster van de crista iliaca grotendeels bestaat, vroeg verschijnselen van een algemeen versterkte botafbraak of -aanmaak zal vertonen.

De technieken die werden gebruikt, de quantitatieve microradiografie (Hoofdstuk IV) en de uitwisselingsproeven met behulp van radioactief gemerkt phosphaat in vitro (Hoofdstuk V) werden onderzocht wat betreft de grootte van de proeffout en wat betreft factoren die de proefuitkomsten kunnen beïnvloeden. Bij de quantitatieve microradiografie werd de röntgenabsorptie van bot vergeleken met die van aluminiumblad. De standaardspreiding van de uitkomsten van de methode bedroeg ongeveer 3.2 bij een einduitkomst van 90 μ aluminium als aequivalent van 100 μ bot. De invloed van de plaats van de crista iliaca-biopsie, van de dikte van het botslijppraeparaat, van verontreinigingen van het botpraeparaat en van onregelmatigheden in de röntgenbundel werden onderzocht.

Bij de phosphaatuitwisselingsproef met bot in vitro werd de uitwisseling gemeten tussen het phosphaat van botpoeder en het phosphaat van een incubatievloeistof met behulp van ^{32}P. De standaardspreiding van de uitkomsten van de methode bedroeg ongeveer 4 bij een proefuitkomst van 100%. De uitkomsten werden opgegeven in procenten van een standaard. Van de totale opneming van ^{32}P door het botpoeder is 80% tot 90% veroorzaakt door werkelijke uitwisseling, terwijl 10 tot 20% wordt veroorzaakt door verplaatsing van phosphaat van de vloeistof naar het bot. Kleine variaties van de pH van de incubatievloeistof hebben vermoedelijk weinig invloed. De korrelgrootte van het botpoeder werd zoveel mogelijk constant gehouden, omdat bij oriënterende proeven bleek, dat toeneming van de korrelgrootte de uitwisseling doet verminderen. Kleine variaties in de plaats van de botbiopsie hebben weinig invloed op de proefuitkomsten. Uit enkele experimenten bleek, dat de keuze van de incubatieperiode van 24 uur, juist is voor het beoogde doel. Verontreinigingen van het botmonster met kraakbeen heeft weinig invloed op de proefuitkomsten.

Het onderzoek betreft zeventien patienten met hyperparathyreoidie. Naast gegevens over het klinisch beeld worden de uitkomsten vermeld van het onderzoek van het

bloedserum op calcium, phosphaat en alkalisch phosphatase, van de urine op phosphaat en calcium en van de bepaling van de phosphaatexcretie-index volgens Nordin en Fraser. De nierfunctie werd nagegaan en röntgenonderzoek van het skelet werd verricht. De uitkomsten van het histologisch onderzoek van botmonsters wordt vermeld. Bij 5 van de 17 patienten werden afwijkingen van het skelet gevonden met behulp van routine-röntgenonderzoek. Slechts bij 2 van 16 patienten werden met behulp van histologisch onderzoek van het bot afwijkingen aangetoond. Van de twee patienten waarvan na de bijschildklieroperatie bot werd verkregen, worden enkele klinische gegevens verstrekt van het ogenblik van de tweede botbiopsie. Een groep van 17 controlepersonen wordt besproken. Gegevens worden vermeld van een groep van 5 patienten met een hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie (Hoofdstuk VI).

In hoofdstuk VII worden de resultaten van het onderzoek van bot met behulp van microradiografie van de in hoofdstuk VI vermelde patienten weergegeven. De 17 patienten met hyperparathyreoidie hadden gemiddeld een aluminium aequivalent van 74.4 $\pm$ 4 μ voor 100 μ bot. Deze waarde is significant lager dan die, die werd gevonden bij de controle groep en welke 84.6 $\pm$ 3.3 μ voor 100 μ bot bedroeg. De twee patienten waarvan het bot voor en na de verwijdering van een bijschildklier adenoom werd onderzocht hadden uitkomsten van respectievelijk 67.3 μ en 74.8 μ voor de operatie en van 80 μ en 78.2 μ na de operatie. De vijf patienten met een hypercalcaemie niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie hadden een mineraal gehalte van het bot overeenkomende met 82 μ aluminium per 100 μ bot.

Het botpoeder van de patienten met hyperparathyreoidie had gemiddeld een verhoogde uitwisseling van phosphaat van het bot tegen dat van de incubatievloeistof. Bij een groep van 17 controlepersonen werd gemiddeld 99 $\pm$ 6.9% van de uitkomst bij de standaard gevonden. Bij de patienten met hyperparathyreoidie werd 123.2 $\pm$ 13.2% gevonden. Het bot van de twee patienten met hyperparathyreoidie, bij wie het onderzoek na de operatie werd herhaald, had voor de operatie uitwisselingspercentages van respectievelijk 130.3% en 136% en na de operatie van 106% en 87%. De vijf patienten met een hypercalcaemie, niet veroorzaakt door een hyperparathyreoidie, hadden een gemiddeld uitwisselingspercentage van het bot van 96% (Hoofdstuk VIII).

Het wiskundig verband tussen het mineraalgehalte van het bot en de uitkomsten van de phosphaatuitwisselingsproef ($R = -0.69$; $P < 0.001$) werd in hoofdstuk IX besproken. Tevens werd in dit hoofdstuk een correlatie aangetoond tussen de uitkomsten van de genoemde twee onderzoekmethoden van het bot en het calciumgehalte van het serum van de patient.

Zowel de lage uitkomst van de bepaling van het mineraalgehalte van het bot als de hoge uitkomst van de phosphaatuitwisselingsproef van bot van patienten met hyperparathyreoidie, vergeleken met bot van controlepersonen, kunnen worden verklaard door aan te nemen, dat het bot van patienten met hyperparathyreoïdie gemiddeld jonger is dan dat van controlepersonen (Hoofdstuk X).

SUMMARY

The connection between the ostitis fibrosa generalisata cystica as described in 1891 by von Recklinghausen, and an abnormal function of the parathyroid glands was found around 1925. This historical development explains why originally hyperparathyroidism was supposed to be a disease of the skeleton.
Gradually however it was observed that this disease may induce completely different syndromes. Many cases are found, where the main symptoms of the disease are due to changes in the kidney.
Sometimes the clinical picture can be explained completely by the hypercalcemia.
It is noteworthy that a disease, which is caused by an excessive production of a hormone with a direct effect on bone metabolism, proceeds in most cases without inducing manifest changes in the skeleton. This lack of changes in the skeleton on X-ray examination, might be explained if we assume that the increased catabolism of bone due to the exces of circulating parathyroid hormone is compensated by an increased formation of bone.
The aim of our investigations was to study the ratio between catabolism and synthesis of bone in patients suffering from hyperparathyroidism.
Therefore we used quantitative microradiography and studied the exchange of phosphate in vitro with samples of bone which were obtained by biopsy from patients (chapter I).

In chapter II a survey is given on our knowledge about the microstructure of bone tissue. It is emphasized that the skeleton has an important function as a storage of minerals which can be mobilized very easily. The exchange of ions in the minerals of bone against those of the surrounding medium are discussed.

In chapter III the method by which the bone biopsies were taken from the crista iliaca is described. A hollow drill as has been described by Sacker and Nordin was used. It is stressed that data from the literature suggest that trabecular bone tissue at a very early phase will

show symptoms of an increased bone synthesis or breakdown. The bone sample which is taken from the crista iliaca mainly consists of such bone tissue.

The techniques which have been used, namely the quantitative microradiography (chapter IV) and the study of the exchange with ^{32}P labelled phosphate in vitro (chapter V) were evaluated. The standard deviation of the methods was determined and some factors which might influence the results were studied.

The quantitative microradiography was performed by comparing the density for X-rays of the bone tissue with that of standard layers of aluminum foil. For standard samples of bone 100 μ bone corresponded to 90 $\pm$ 3.2 μ aluminum foil.

The effect of the localization of the place where the biopsy was taken, of the thickness of the bone slice, of the inhomogeneity of the bone preparation and of the X-ray beam were studied.

In the experiments on the phosphate exchange all data are expressed as a percentage of the value which was found in a standard bone powder. The standard deviation of the method was found to be about 4%.

It was found that from the total ^{32}P uptake by the bone tissue about 80-90% is due to real exchange between the phosphate of the bone and of the incubation medium. About 10-20% represents uptake of phosphate from the medium by the bone. The phosphate exchange is rather endependent of small changes in the pH of the incubation medium. The size of the grains of the bone powder was kept constant as far as possible. If was found that with an increase in the size of the grains, the exchange is decreased. Small variations in the place where the biopsy was performed have neglectable effects on the results. The incubation period of 24 hrs was found to be optimal. Contamination of the bone powder with cartilagous tissue does not seriously influence the results.

In the clinical investigations seventeen patients suffering from hyperparathyroidism were studied. Apart from the clinical picture the data on the calcium, phosphorus and alkaline phosphatase content of the serum, as well as on the calcium and phosphorus content of the urine are given. The phosphate excretion index was determined according to Nordin and Fraser. The kidney function of the patients was determined and X-ray pictures of the skeleton were made. Furthermore the results of the his-

tological examination of the bone biopsy samples are presented.
In 5 out of the 17 patients we found on routine X-ray examination changes in the skeleton. In only 2 out of the 16 patients, histological examination revealed abnormalities in the bone.
In two patients a bone biopsy was taken after a tumor of their parathyroid gland had been removed. Their clinical condition at the time of this biopsy is discussed.
In chapter VI are also summarized the results of our study of 17 controle individuals and of 5 patients suffering from hypercalcemia, which was not due to a hyperfunction of the parathyroid glands.

In chapter VII the results of our investigations with the aid of microradiography on the bone biopsies of the patients which were discussed in chapter VI are presented.
The mean value which was found in 17 patients with hyperparathyroidism was an aluminum equivalent for 100 μ bone of 74.4 ± 4 μ . This is significantly lower than the value which was found to be an equivalent of 84.6 ± 3.3 μ aluminum for 100 μ bone in normal individuals.
The two patients which were studied before and after the removal of a tumor of the parathyroid glands showed values of respectively 67.3 μ and 74.8 μ before the operation and 80 and 78.2 μ after the operation. The data represent the equivalent of aluminum for 100 μ bone.
The 5 patients suffering from hypercalcemia, which was not induced by a hyperfunction of the parathyroid glands had a mineral content of the bone equivalent to 82 μ aluminum per 100 μ bone.

The bone powder of the patients with hyperparathyroidism had an increased capacity to exchange phosphate with the incubation medium. In a group of 17 normal controls a mean value of 99 ± 6.9% of the value, found in the standard bone powder, was found. In the patients however this value had significantly increased to 123.2 ± 13.2%.
The uptake of phosphate from the incubation medium was found to be higher in bone samples from the patients than in those from the normal individuals.
In the bone powders which were prepared from the biopsies taken from the two patients with hyperparathyroidism which were studied before and after the operation, we found values of respectively 140.3% and 136% before the operation and 106% and 87% after the operation.

In the five patients with a hypercalcemia, which was not due to hyperparathyroidism, the phosphate exchange of the bone powder had a mean value of 96%.

Statistical analysis of the results which were obtained learned that a positive correlation exists between the mineral content of the bone and the results of the test on the phosphate exchange ($R = -0.69$ $p < 0.001$). Furthermore such a correlation was shown to exist between the results of these two methods and the calcium content of the serum of the patient.

The difference in mineral content of the bone and in the capacity for exchanging phosphate with the surrounding medium, which exist between the bone from patients with hyperparathyroidism and from normal individuals, suggest that in these patients the bone tissue has a higher turnover rate than in normal individuals.

LITERATUUR

Algemene literatuur:

Bourne, G.H.: The Biochemistry and Physiology of Bone, Academic Press Inc. Publisher, New York, 1956.
Engström, A., Björnerstedt, R., Clemedson, C.J., Nelson, A.: Bone and Radiostrontium, Almqvist & Wiksell, Stockholm; John Wiley & Sons, Inc. New York, 1957.
Neuman, W.F. and Neuman, M.W.: The chemical Dynamics of Bone Mineral, The University of Chicago Press, 1958.
Wolstenholme, G.E.W. en O'Connor, C.M., Ciba Foundation Symposium on Bone Structure and Metabolism, J. & A. Churchill Ltd. 104 Gloucester Place, London W.I., 1956.
Albright, F. and Reifenstein, E.C., Jr. 1948: The parathyroid glands and metabolic bone disease, London, Bailliere, Tindal & Cox, 1948.
Engström, A.: Quantitative micro- and histochemical elementary analysis by röntgen absorption spectrography, Acta Radiologica Supplementum LXIII, 1946.
Albrigth, F.: A page out of the history of hyperparathyroidism, J. Clin. Endocr. Vol. 8, Aug. 1948, Nr. 8.

Literatuur, waarnaar in de tekst werd verwezen:

Albright, F., Sulkowitch, H. W. and Bloomberg, E.: Am. J. Med. Sci., 1937, 193, 800.
Albright, F., Sulkowitch, H. W. and Bloomberg, E.: J. Clin. invest. Vol. XVIII, 1939.
Albright, F.: J. Clin. Endocr. Vol. 8, Aug. 1948, Nr. 8.
Amprino, R. Arch. Sci. Biol. 1946, XXXI, 208.
Amprino, R., Arch. Biol. 1947, Tome LVIII, Fasc. 4, blz. 1.
Amprino, R., Zellforsch., Bd. 37, S. 144-183 (1952).
Amprino, R., Experientia, 1952, VIII, 20.
Amprino, R., Experientia, 1952, VIII, 380.
Amprino, R. en Engström, A., Acta Anatomica, 1952, XV, 1.

Armstrong, W. D., Ann. Acad. Sci., Vol. 60, Art. 5, April, 1955.
Arnold, J. S., Jee, W. S. S., Johnson, K.: Amer. J. Anat. Vol. 98, 1956.
Barer, R., Nature 1952, 169, blz. 366.
Barnicot, N. A., J. Anat. 82, blz. 233, 1948.
Baud, Ch. A., Praxis 1957, 15, blz. 329.
Bauer, W., Aub. J. C. and Albright, F., J. Exp. Med. 1929, 49, blz. 145.
Bauer, G. C. H., Acta Orth. Scand., Vol. 23, 1953-'54, blz. 247.
Bauer, G. C. H., Carlsson, G., Lindquist, B., Kungl. Fysiogr. Sälskapets I lund förhandlingar, Vol. 25, Nr. 1, 1955.
Bauer, G. C., Carlsson, A., J. of Bone and J. Surg. Br. Vol. 37 B, 1955, p. 658.
Bauer, G. C., Carlsson, A., Lindquist, B., Acta Paed. 44, Sept. 1955, blz. 477-486.
Bax, H. R., N. T. v. G. II, 14, 8 April 1950, blz. 1012.
Baxter, K. L., A Ciba foundation Symposium, 118, 1955.
Bellin, J. en Lazlo, D., Met. Interr. V., 1953, blz. 364.
Bhaskar, S. N., J. Bone and J. Surg. Vol. 38 A, nr. 6, December 1956.
Black, B. M. and Zimmer, J. F., A. M. A. Arch. Surg. 1956, 72, blz. 830-837.
Bloom, W., Bloom, M. A. and McLean, F. C., Anat. Rec. 1941, 81, blz. 443.
Bogdonoff, M. D., Woods, A. H., White, J. E. and Engel, F. L., Yearb. of Endocr. 1956-1957, 155.
Bontness, R. W. and Taussky, H. H.: J. Biol. Chem., 1945, Vol. 158, blz. 581.
Briggs, A. P., J. Biol. Chem. 53, 13, 1922; 59, 255, 1924.
Bronner, F., Harris, R. S., Maletskos, C. J., Benda, C. E., J. Clin. Invest., Vol. XXXV, Jan. 1956, Nr. 1, blz. 78.
Bruins-Slot. Dr. W. J., N. T. v. G., 96, III, M 35, blz. 2114.
McCance, R. A. en Widdowson, E. M.: J. Physiol. 1942, 101, 304.
Carlström, D. and Finean, J. B., Biochem. en Biophys. Acta 13, blz. 183, 1954.
Clark, E. P. en Collip, J. B.: J. Biol. Chem. 63, 461, 1925.
Collip, J. B., Pugsley, L. I., Selye, H., Thomson, D. L. Br. J. Exp. Path., 15, 335, 1934.
Copp, D. H., Frederickson, J. M. en Jong, B. de, Rev. Canad. Biol. 1955, 14, blz. 244.

Dallemagne, M. J., Jos. Macy IV Conf. on Met. Interr. 1952.
Dallemagne, M. J. en Fabry, Cl., Ciba Foundation Symposium, 16, 1955.
Davies, R. E. Kornberg, H. L. and Wilson, G. M., Biochem. J. 1952, XV.
Davis, K. G. en Engström, A., Exp. Cell. 1954, 7, blz. 243.
Deitrick, J. E., Whedon, G. D. en Shorr, E., Am. J. Med. Vol. VI, Nr 6, 1949, pag. 684-711.
Dixon, T. F. en Perkings, H. R. 1956; Bourne, G. H. 1956, The Biochemistry en Physiology and Bone, blz. 288.
Eastoe, J. E. and Eastoe, B., Biochem. J., 57, blz. 453, 1954.
Eastoe, J. E., The Biochemistry and Physiology of Bone, New York, 1956, 81.
Edelman, I. S., James, A. H. en Moore, F. D., : Josiah Macy IV Conf. on Metabolic Interrelations, 240, 1952.
Edholm, D. G., Howarth, S. en McMichael, J. : Clin. Sci. 5, 1945.
Engfeldt, B. en Hjertquist, S. O. : Acta Path. Microbiol. Scand.
Engfeldt, B., Acta Path. Microbiol. Scand. 1953, XXXII, blz. 529.
Engfeldt, B. en Zetterström, R. : Endocrinology, Vol. 54, Nr. 5, May 1954, blz. 514.
Engström, A. : Acta Radiol. Suppl. LXIII, Stockholm, 1946.
Engström, A. : Experientia 6, blz. 267, 1950.
Engström, A., Lindström, B. : Biochim. Biophys, acta 4, blz. 359, 1950.
Engström, A., Amprino, R. : Experientia 6, blz. 267, 1950.
Engström, A., en Lindström, B. : Acta Radiol. 1951, XXXV, 33.
Engström, A., Engfeldt, B. en Zetterström, R. : Experientia 1952, VIII, blz. 259.
Engström, A., Bellman, S. en Engfeldt, B. : Brit. J. Radiol. 1954.
Engström, A., Exp. Cell Res. 1955, Suppl. 3, blz. 117-123.
Engström, A. en Greulich, R. C. : J. Appl. Physics, 1956, 27, blz. 758.
Engström, A., Björnerstedt, R., Clemedson. C. J. en Nelson, A. : Bone and Radiostrontium, 1957.
Falkenheim, M., Neuman, W. F. en Hodge, H. C. : J. Biol. Chem. 1947, 169, blz. 713.
Frederickson, J. M., Honour, A. J. en Copp. D. H. : Am. Physiol. Soc. 1955, 49.

Frederickson, J. M., Honour, A. J. en Copp, D. H. : Fed. Proc. 14, 49, 1955.
Gaillard, P. J., Exp. Cell. Res. Suppl. 3, 154-169, 1955.
Gaillard, P. J., Schweiz. Med. schr. 1957, suppl. bij nr. 14, blz. 447.
Goby, P. : Comptes Rendus de l'Academie des Sci., 1913, 156, 686-688.
Gorter, E. en de Graaf, W. C. : Klinische diagnostiek, deel I, 1955, blz. 228.
Hanson, A. M., Military Surgeon, 1924, 54, 218-219.
Hellström, J., Acta Chir. Scand. Vol. C 100, blz. 391.
Hellström, J., Acta Endocr. 16, 30-58, 1954.
Hendricks, S. B. and Hill, W. L., Proc. Nat. Acad. Sci. 36: 731, 1950.
Hendricks, S. B. en Hill, W. L., 1950, geciteerd in Bourne G. H., 1956, Biochemistry and Physiology of Bone, blz. 288.
Hendricks, S B. and Hill, W. L., J. Macy Conf. on Metab. Interrel. 3, 173, 1951.
Hodge, H. C., J. Biol. Chem. 138, 451, 1941.
Holmstrand, K. Acta Ortopaed. Scand., suppl. XXVI, 1957.
Istock, J. T., Miller, C. W. en Losee, F. L. : U. S. Armed Forces Med. J. 1957, VIII, 991.
Jansen, M. T., Tijdschrift voor Tandheelkunde, 58e jaargang, April 1951, nr. 4.
Johansson, E. G., Falkenheim, M. en Hodge, H. C. : J. of Biol. Chem. 1945, 159, 129.
Johansson, E. G., Falkenheim, M. en Hodge, H. C., J. of Biol. Chem. 1945, 160, 637.
Klement, R. : Ber. dtsch. Chem. 1936, Band II, Abt. B., blz. 2232.
Klement, R. : Naturwissenschaften, Heft 10, Maart 1938.
Klement, R. : Naturwissenschaften, Heft 26. 145, 1938.
Krane, S. M., Brownell, G. H., Stanbury, J. B. en Corrigan, H., J. Clin. Invest. XXXV, blz. 874, 1956.
Lacroix, P., Experientia, 1952, VIII, blz. 426.
McLean, F. C. and Bloom, W. : Arch. Path. Vol. 32, No. 3 1941, blz. 315.
McLean, F. C. and Urist, M. R. : Bone, An introduction to the Physiology of skeletal tissue, blz. 34, 1955.
Leblond, C. P., Belanger, L. F. en Greulich, R. C. : Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 60, Art. 5.
Lefevre Manly, M. en Levy, S. R. : J. Am. Chem. Soc. Vol. LXI, 1939, blz. 2588.

Mandl, F. 1926, Arch. Klin. Chir. 143, blz. 245-284.
Manly, M. L. : J. Amer. Chem. Soc. 61, blz. 2588, 1939.
Marden Black, M. D. and Zimmer, J. F. : Arch. Surg. Vol. 72, No. 6, Juni 1956, blz. 830.
Mather, G. H. : Brit. Med. J. Aug. 1953, blz. 424.
Mitchell, H. H., Hamilton, T. S., Steggerda, F. R. en Bean, H. W. : J. Biol. Chem. 158, 1945, blz. 625 - 637.
Neumann, H. : uit Chemie en kliniek, deel III, 1952 (E. C. Noyons).
Neuman, W. F. : J. Macy Found. IIe conf., p. 32, 1950.
Neuman, W. F. en Riley, R. F. : J. Biol. Chem. 1947, 168, blz. 545.
Neuman, W. F., Toribara, T. Y. en Mulryan, B. J. : J. Amer. Chem. Soc. 75, blz. 4239, 1953.
Neuman, W. F., Neuman, M. W., Main, E. R. and Mulryan, B. J. : J. Biol. Chem. Vol. 179, 1949, blz. 341.
Neuman, W. F. en Neuman, M. W. : The chemical Dynamics of Bone Mineral, 1958.
Nicolaysen, R., Eeg-Larsen, N. en Malm, O. J. : Physiol. Rev. 1953, 33, blz. 434.
Nordin, B. F. C. en Fraser, R. : A Ciba found. symposium, 1956, p. 222.
Norris, W. P. : Intern. Abstracts Surg. 84, 1. 1947.
Owen, M., : J. of Bone and Joint Surgery, 1956, 38B, blz. 761.
Park, E. A. : Arch. dis. child. 29, 269, 369.
Recklinghausen, Prof. F. v., Festschrift Rudolf Virchow, 1891.
Robinson, R. A. : J. Bone and Joint Surgery 1952, 34A, 389.
Robinson, R. A. en Watson, M. L., 1953, J. Macy Conf. Metabolic Interrelations V, blz. 98.
Rubin, M. 1953, Metabolic Interrelations, Jan. 5 en 6, blz. 355.
Sacker, L. S. en Nordin, B. E. C. : Lancet 1954, 1, blz. 347.
Sandström, I., Upsala Läkareförenings Förhandlingar 15: 441-471, 1879-1880.
Smith, K. W., Marks, H. P., Fieller, E. C., Broom, W. A. : Quarterly Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. XVII, 1944, blz. 110.
Snapper, I. : Medical Clinics on bone diseases, 1949.
Wallgren, G. : Acta paed. suppl. 113, blz. 15, 1957.
Weikel, J. H. Neuman, W. F. en Feldman, I. : J. Amer. Chem. Soc., 76, blz. 5202, 1954.
Whedon, G. D., Deitrick, J. E. en Shorr, E. : Amer. J. Med. Vol. VI, No. 6, 1949, blz. 684-711.

Winberg, J., Bergstrand, C.G., Engfeldt, B., Zetterström, R.: Acta Paed. 43: blz. 347-361, 1954.
Zetterström, R., Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, blz. 283.
Zetterström, R. en Engfeldt, B., Nature 1951, 168, 81.

STELLINGEN

I. Het microradiogram van beenweefsel weerspiegelt de verhouding tussen de hoeveelheden jong en oud bot.

II. De afmetingen en de vorm van botkristallen zijn niet nauwkeurig gekend.

III. Bij botafbraak worden matrix en mineralen tegelijkertijd afgebroken.

IV. Door een graviditeit kunnen antilichamen tegen leucocyten worden gevormd, welke ongewenste reacties op bloedtransfusies tengevolge kunnen hebben.

V. Bij celdeling wordt het in een chromatide aanwezige desoxyribonucleine zuur in de volgende generaties gewoonlijk als eenheid bewaard.

VI. Het is niet bewezen, dat de levensduur van patienten met varices in de oesophagus, die tot bloeding hebben geleid, gunstig wordt beinvloed door operaties, die bedoeld zijn om de druk in de vena porta te verlagen.

VII. Het geslacht waarin een kind wordt opgevoed dient niet in de eerste plaats te worden bepaald door het histologisch beeld van de gonaden, noch door de chromatine structuur van de celkern.

VIII. Het gebruik van het woord insulinase voor een proteolytisch enzym, dat zowel de afbraak van insuline als van andere polypeptiden bevordert, is verwarrend.

IX. De nierbeschadiging tengevolge van phenolphtaleine zou veroorzaakt kunnen worden door een tekort aan kalium.

X. Het afvalwater van Westelijk Salland dient niet te worden geloosd op de Sallandse weteringen, doch op de IJsel.